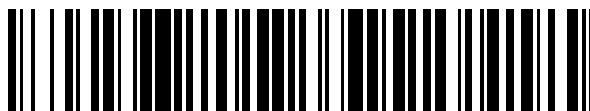


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 400**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2011 E 11791120 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2638157**

54 Título: **Métodos y dispositivos para la síntesis de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

30.11.2010 US 418095 P

23.03.2011 US 201161466814 P

01.07.2011 US 201161503722 P

12.11.2010 US 412937 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2015

73 Titular/es:

**GEN9, INC. (100.0%)
840 Memorial Drive
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**JACOBSON, JOSEPH;
KUNG, LI-YUN A.;
WILSON, ANDREW KIRK;
RAMU, SENTHIL;
SCHINDLER, DANIEL y
HUDSON, MIKE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 548 400 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y dispositivos para la síntesis de ácidos nucleicos

5 **Campo de la invención**

Los métodos y aparatos proporcionados en el presente documento se refieren a la síntesis y ensamblaje de ácidos nucleicos y bibliotecas de ácido nucleico que tienen una secuencia predefinida. Más particularmente, se proporcionan métodos y aparatos para la síntesis de polinucleótidos diana en un soporte sólido y para la selección de los polinucleótidos diana.

Antecedentes

El empleo de las técnicas de química de ADN recombinante, es hoy en día común para las secuencias de ADN que se van a replicar y amplificar a partir de la naturaleza y después desensamblar en partes del componente. Según las partes del componente, las secuencias se recombinan o se vuelven a ensamblar después en nuevas secuencias de ADN. Sin embargo, la dependencia en las secuencias disponibles de forma natural limita significativamente las posibilidades que pueden estudiar los investigadores. Mientras que en la actualidad es posible para las secuencias cortas de ADN sintetizarse directamente a partir de nucleósidos individuales, ha sido poco factible en general construir directamente grandes segmentos o ensamblajes de polinucleótidos, es decir, secuencias polinucleótidas más largas de aproximadamente 400 pares de bases.

Se puede realizar la síntesis de oligonucleótidos mediante síntesis personalizadas masivamente paralelas en microchips (Zhou *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* 32:5409; Fodor *et al.* (1991) *Science* 251:767). Sin embargo, los microchips actuales tienen áreas de superficie muy bajas y por tanto sólo pueden producirse pequeñas cantidades de oligonucleótidos. Cuando se liberan en la solución, los oligonucleótidos se presentan en concentraciones picomolares o inferiores por secuencia, concentraciones que no son suficientemente elevadas para impulsar las reacciones de cebado bimoleculares de manera eficiente. Los métodos actuales para ensamblar ácidos nucleicos requieren que se amplifiquen los oligonucleótidos de microchips antes del ensamblaje. Como tal, sigue habiendo una necesidad de mejora de métodos y dispositivos rentables para el ensamblaje de genes de alta fidelidad y la producción de un gran número de secuencias polinucleótidas.

El documento WO2004/024886 informa sobre la síntesis *in vitro* y el ensamblaje de polinucleótidos de longitud génica, largos basado en un ensamblaje de múltiples oligonucleótidos más cortos sintetizados *in situ* en una plataforma de micromatrices. El documento WO2005/059096 informa sobre la producción de moléculas de ácido nucleico largas con un control del usuario preciso en el contenido de la secuencia. El documento WO2010/025310 informa sobre métodos para sintetizar y/o ensamblar al menos un producto polinucleótido que tiene una secuencia predefinida a partir de una pluralidad de oligonucleótidos diferentes. El documento DE114343591 informa sobre la producción de elementos funcionales oligoméricos o poliméricos (EF) mediante el enlace de al menos dos elementos de diseño (ED). El documento WO01/88173 informa sobre métodos de preparación de un polinucleótido que tiene al menos 200 nucleótidos en una dirección 5' a 3' o 3' a 5' ligando una pluralidad de oligonucleótidos, cuyo ensamblaje, representa la secuencia nucleótida del polinucleótido deseado. El documento WO99/47536 informa sobre un método recursivo para sintetizar moléculas de ácido nucleico que implica ciclos de unión de moléculas de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico preparada. El documento EP2175021 informa sobre la síntesis de hebras dobles de ácido nucleico de una secuencia opcional en un soporte que tiene un área de superficie que contiene una pluralidad de áreas de reacción individual. El documento WO00/29616 informa sobre métodos de ensamblaje de un polinucleótido en un soporte sólido realizando etapas de hibridación, ligamiento, y extensión. El documento WO00/75368 informa sobre métodos para la síntesis en fragmentos de ADN en una matriz sólida. Los documentos EP1314783 y EP1411122 informan sobre una molécula de ácido nucleico monocatenario para su uso en la preparación de ácido nucleico, que comprende una secuencia que corresponde al sitio de reconocimiento de una enzima de restricción tipo IIS, y una secuencia arbitraria pero definida de nucleótidos. El documento WO2006/076679 informa sobre la producción de proteínas con características deseadas mediante la expresión y exploración de ácidos nucleicos codificantes. El documento WO2006/044956 informa sobre métodos de fabricación de ADN sintético mediante el ensamblaje multiplexado de oligonucleótidos sintéticos. El documento WO99/14318 informa sobre la síntesis química completa y el ensamblaje de genes y genomas. El documento WO2007/010252 y el documento WO2008/041002 informan sobre la secuenciación por pares de una plantilla polinucleótida bicatenaria.

Sumario

Los aspectos de la invención se refieren a métodos y aparatos para preparar y/o ensamblar polímeros de alta fidelidad. En el presente documento se proporciona también dispositivos y métodos para procesar reacciones de ensamblaje de ácido nucleico y ácidos nucleicos ensamblados. Es objeto de la presente invención proporcionar métodos económicos, prácticos para sintetizar ácidos nucleicos personalizados.

Los aspectos de la invención se refieren a métodos y dispositivos para producir un polinucleótido que tiene una secuencia predeterminada en un soporte sólido. En algunas realizaciones, se proporcionan pluralidades de

oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte en características diferentes de un soporte sólido, cada pluralidad de oligonucleótidos tiene una secuencia predefinida, siendo cada pluralidad unida a una característica discreta diferente del soporte. En algunas realizaciones, cada pluralidad de oligonucleótidos comprende una región de secuencia en su extremo 3' que es complementaria a una región de secuencia de un extremo 3' de otro oligonucleótido y en la que la primera pluralidad de oligonucleótidos tiene un extremo 5' que es complementario a un extremo 5' de un primer oligonucleótido monocatenario de anclaje. En algunas realizaciones, la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte se inmoviliza en el soporte. En algunas realizaciones la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte se sintetiza en el soporte sólido. En otras realizaciones, la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte se deposita en el soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte es un dispositivo de micromatrices.

Según algunas realizaciones, se proporcionan al menos una primera y una segunda pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte, en la que cada primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos tienen una secuencia predefinida y se unen a una característica discreta del soporte. En algunas realizaciones, cada primera pluralidad de oligonucleótidos comprende una región de secuencia en su extremo 3' que es complementaria a una región de secuencia de un extremo 3' de la segunda pluralidad de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, se proporciona una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte, en la que el extremo 5' de la pluralidad del primer oligonucleótido de anclaje es igual que una región de secuencia de la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte. Al menos se generan una primera y una segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción complementarias a la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte en una reacción de extensión de la cadena. Los oligonucleótidos de construcción pueden hibridarse en la pluralidad de oligonucleótidos de anclaje en una característica seleccionada. Al menos se ligan la primera y la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción, generando de este modo al menos un polinucleótido que tiene una secuencia predefinida. En algunas realizaciones, al menos se disocian la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción a partir de al menos la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción se transfiere de una primera característica a una característica seleccionada y la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción se transfiere de una segunda característica a la característica seleccionada, en la que la característica seleccionada comprende una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte. En algunas realizaciones, la característica seleccionada se encuentra en el mismo soporte que la primera y la segunda característica. En otras realizaciones, la característica seleccionada se encuentra en un soporte diferente al de la primera y segunda característica. En algunas realizaciones, se proporciona una tercera pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte, en la que cada tercera pluralidad de oligonucleótidos tiene una secuencia predefinida y se une a una tercera característica discreta del soporte, cada tercera pluralidad de oligonucleótidos comprende una región de secuencia en su extremo 3' que es complementaria a una región de secuencia de un extremo 3' de la segunda pluralidad de oligonucleótidos. La tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción complementaria a la tercera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte se genera en una reacción de extensión de la cadena empleando oligonucleótidos monocatenarios únicos como plantillas. La primera, segunda y tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción se hibrida en la pluralidad de oligonucleótidos de anclaje en una característica seleccionada y ligada para producir un polinucleótido más largo. En algunas realizaciones, cada pluralidad de oligonucleótidos de construcción se genera en un soporte diferente. En algunas realizaciones, cada pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte tiene un sitio de unión al cebador en su extremo 3'. El sitio de unión al cebador puede ser un sitio de unión al cebador universal. En algunas realizaciones, el método comprende hibridar un cebador en al menos la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte en condiciones que favorecen la extensión del cebador, formando de este modo duplexos del producto de extensión. En algunas realizaciones, la secuencia cebadora comprende al menos un uracilo. En algunas realizaciones, el cebador que contiene uracilo se elimina utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa endonucleasa VIII.

En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar pluralidades N de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte predefinidos, en el que la primera pluralidad de oligonucleótidos comprende en su extremo 3 una región de secuencia que es complementaria a una región de secuencia en el extremo 3' de un segundo oligonucleótido, en el que la pluralidad N de oligonucleótidos comprende en su extremo 3' una región de secuencia complementaria a una región de secuencia del oligonucleótido (N-1); y proporcionar una primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje que comprende en su extremo 5' una secuencia que es igual que una región de secuencia de la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte. En algunas realizaciones, se generan pluralidades N de oligonucleótidos de construcción complementarias a los oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte, las pluralidades de oligonucleótidos de construcción abarcan la secuencia completa del polinucleótido sin espacios. En algunas realizaciones, la región de secuencia del extremo 3' de la primera pluralidad de los oligonucleótidos unidos al soporte es idéntica a la región del extremo 5' de los oligonucleótidos de anclaje. En algunas realizaciones, los productos de extensión se disocian de este modo al liberar al menos la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción.

Los aspectos de la invención se refieren a un método de síntesis y de selección de un polinucleótido que tiene una secuencia definida. El método comprende sintetizar una pluralidad de polinucleótidos bicatenarios unidos al soporte que comprende un saliente monocatenario libre, la pluralidad de secuencias polinucleótidas comprende la secuencia

polinucleótida definida, en la que el saliente monocatenario comprende la secuencia de una construcción de oligonucleótido N terminal. Los métodos comprenden hibridar un grupo de oligonucleótidos a un oligonucleótido monocatenario unido al soporte de anclaje, el grupo oligonucleótido comprende pluralidades N de oligonucleótidos, en el que la primera pluralidad de oligonucleótidos comprende en su extremo 5' una región de secuencia que es complementaria a una región de secuencia en el extremo 5' del oligonucleótido de anclaje, en el que una pluralidad N de oligonucleótidos comprende en su extremo 3' una secuencia complementaria a una región de secuencia del oligonucleótido (N-1). En algunas realizaciones, el oligonucleótido de anclaje y los polinucleótidos se liberan desde el soporte empleando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII. En algunas realizaciones, se liberan los polinucleótidos desde el soporte por ejemplo empleando un enzima de restricción tipo II. En algunas realizaciones, se amplifica la secuencia polinucleótida definida.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para sintetizar un polinucleótido que tiene una secuencia predefinida y seleccionar la secuencia polinucleótida predefinida según su secuencia y su longitud. En algunas realizaciones, se proporciona un soporte que comprende (i) una primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte, en el que el extremo 5' de la primera pluralidad de oligonucleótido de anclaje es complementario al extremo 5' de una primera pluralidad de oligonucleótidos y (ii) una segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte en el que el extremo 5' del segundo oligonucleótido de anclaje es complementario a una construcción de oligonucleótido N terminal. En algunas realizaciones, se sintetiza una pluralidad de polinucleótidos bicatenarios unidos al soporte que comprende un saliente monocatenario. La pluralidad de secuencias polinucleótidas comprende la secuencia polinucleótida predefinida, en la que un saliente 5' monocatenario de la secuencia polinucleótida predefinida comprende la secuencia de construcción del oligonucleótido N terminal y el extremo 3' monocatenario de la secuencia polinucleótida comprende la primera secuencia polinucleótida. Se hibrida la pluralidad de polinucleótidos sintetizados, en condiciones de hibridación, en la primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje. En algunas realizaciones, los polinucleótidos sintetizados se someten a condiciones de hibridación, tales como el oligonucleótido N terminal en el extremo 5' de la segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje, seleccionando de este modo los polinucleótidos que tienen la secuencia predefinida utilizando el segundo oligonucleótido de anclaje. En algunas realizaciones, las secuencias polinucleótidas que tienen un extremo 3' o 5' libre se degradan utilizando una exonucleasa específica monocatenaria. En algunas realizaciones, los polinucleótidos que tienen la secuencia predefinida se liberan además del soporte, por ejemplo utilizando una endonucleasa tipo II o utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII. En realizaciones preferentes, se separa la primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje de la segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje mediante una distancia correspondiente a la longitud del polinucleótido predefinido. El soporte puede comprender oligonucleótidos monocatenarios separadores unidos al soporte para fijar la distancia entre el primer y segundo oligonucleótido de anclaje. En algunas realizaciones, la distancia entre el primer y segundo oligonucleótido de anclaje es una función de una concentración del primer y segundo oligonucleótido de anclaje y de la concentración del oligonucleótido separador.

Algunos aspectos de la realización se refieren a una matriz de ácido nucleico que comprende (a) un soporte sólido; (b) una pluralidad de características discretas asociadas con el soporte sólido, en la que cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte que tiene una secuencia predefinida, en la que la primera pluralidad de oligonucleótidos comprende en su extremo 5' una región de secuencia que es complementaria a una región de secuencia en el extremo 5' de un segundo oligonucleótido, en el que una pluralidad de oligonucleótidos N comprende en su extremo 5' una secuencia complementaria a una región de secuencia del extremo 5' de una pluralidad de oligonucleótidos (N-1); y (c) al menos una primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje comprende en su extremo 5' una secuencia que es idéntica a una región de secuencia de la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte. En algunas realizaciones, la matriz de ácido nucleico comprende además una segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte, en el que el extremo 5' del segundo oligonucleótido de anclaje es idéntico al extremo 5' de la pluralidad de oligonucleótidos N. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende además una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte que tiene una secuencia que no es idéntica a la pluralidad de la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte.

Los aspectos de la invención se refieren a un proceso paralelo y secuencial para la preparación de una pluralidad de polinucleótidos que tiene una secuencia predefinida en un soporte. En algunas realizaciones, se proporcionan un primer y segundo soporte que tienen una pluralidad de características, en la que cada característica en cada soporte comprende una pluralidad de oligonucleótidos diferentes unidos al soporte que tiene una secuencia predefinida. Se genera una primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos de diferentes construcciones que tienen una secuencia predefinida diferente utilizando la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte como plantillas, la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción tienen en su extremo 3' secuencias complementarias. En algunas realizaciones, se proporciona un soporte que comprende una pluralidad de características, en la que cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte. En algunas realizaciones, el extremo 5' de cada pluralidad de oligonucleótidos de anclaje es complementario al extremo 5' de la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción. Se puede hibridar la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción a los oligonucleótidos de anclaje que forman una primera pluralidad de duplexos que tiene un saliente 3'. Se puede hibridar a continuación la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción a la primera pluralidad de duplexos a través del saliente 3', formando de este modo una pluralidad de duplexos con

un saliente 5'. De manera opcional, en función de la longitud del(los) polinucleótido(s) que se va(n) a sintetizar, se hibrida una tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción en la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción a través del saliente 5'. Se pueden ligar las pluralidades de oligonucleótidos de construcción para formar los polinucleótidos bicatenarios. En algunas realizaciones, la etapa de generar la pluralidad de los primeros oligonucleótidos de construcción comprende la hibridación de una secuencia cebadora que tiene al menos un uracilo en la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte en condiciones que favorecen la extensión del cebador y la eliminación del cebador utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII. En algunas realizaciones, se sintetizan las pluralidades de oligonucleótidos de construcción que definen cada uno de los polinucleótidos en un soporte diferente. Se puede ensamblar la pluralidad de polinucleótidos diferentes en una característica diferente del soporte que comprende los oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte.

Los aspectos de la invención se refieren a métodos y dispositivos para sintetizar una pluralidad de polinucleótidos que tiene una secuencia predefinida. En algunas realizaciones, el método comprende las etapas de (a) proporcionar un primer soporte que comprende una pluralidad de características, en la que cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte, en la que el extremo 5' de cada pluralidad de oligonucleótidos de anclaje es complementaria al extremo 5' una primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción; (b) proporcionar un segundo soporte que tiene una pluralidad de características, en la que cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte, cada pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte tiene una secuencia predefinida diferente; (c) generar una primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción que tienen secuencias predefinidas diferentes utilizando la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte como plantillas; (d) posicionar el primer y el segundo soporte de manera que se alinee cada característica del segundo soporte a una característica correspondiente del primer soporte; (e) liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción en una solución en condiciones que favorecen la hibridación de la primera pluralidad de oligonucleótidos a la pluralidad de oligonucleótidos de anclaje; y (f) repetir opcionalmente las etapas b-e con un tercer soporte que comprende una segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción, la segunda y la tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción tienen secuencias complementarias del extremo 3'. En algunas realizaciones, el segundo soporte se posiciona arriba y orientado al primer soporte. En algunas realizaciones, el tercer soporte comprende una pluralidad de polinucleótidos inmovilizados mediante la hibridación en una pluralidad de oligonucleótidos de anclaje.

En algunas realizaciones, la etapa para generar la pluralidad de los primeros oligonucleótidos de construcción comprende hibridar una secuencia cebadora que tiene al menos un uracilo en la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte en condiciones que favorecen la extensión del cebador y eliminar el cebador utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII. El segundo soporte se puede posicionar arriba y orientado al primer soporte. En algunas realizaciones, la solución comprende una ligasa que permite el ligamiento de la segunda y tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción.

En algunas realizaciones, la etapa para liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción en solución permite la difusión de la primera pluralidad de oligonucleótidos a los oligonucleótidos de anclaje.

En algunas realizaciones, la etapa para liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción en solución se encuentra en presencia de una membrana permeable que permite una difusión vertical sustancial de oligonucleótidos de construcción a los oligonucleótidos de anclaje. En algunas realizaciones, la membrana permeable reduce la difusión lateral de oligonucleótidos de construcción.

En algunas realizaciones, cada característica del segundo soporte comprende una pluralidad de oligonucleótidos, en la que la pluralidad de oligonucleótidos comprende al menos dos poblaciones de oligonucleótidos que tienen secuencias predefinidas diferentes, al menos dos poblaciones de oligonucleótidos que tienen secuencias complementarias. Por ejemplo, las dos poblaciones de oligonucleótidos comprenden secuencias complementarias del extremo 3'. En algunas realizaciones, las dos poblaciones de oligonucleótidos se liberan en solución permitiendo de este modo la hibridación de la primera población de oligonucleótidos de construcción a la segunda población de oligonucleótidos de construcción y la hibridación de la primera población de oligonucleótidos a los oligonucleótidos de anclaje. En algunas realizaciones, la solución comprende una ligasa. En algunas realizaciones, la estequiometría de la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción es mayor que la estequiometría de los oligonucleótidos de anclaje.

En algunas realizaciones, el método para sintetizar una pluralidad de polinucleótidos que tiene una secuencia predefinida comprende además la exposición de la pluralidad de polinucleótidos en un mal apareamiento que reconoce y escinde el componente en condiciones adecuadas para la escisión de polinucleótidos bicatenarios que contienen un mal apareamiento. La pluralidad de polinucleótidos puede unirse al soporte o en solución. El mal apareamiento que reconoce y escinde el componente puede comprender una endonucleasa mal apareada tal como una enzima CEL I.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 ilustra un método ejemplar no limitante de la síntesis del ácido nucleico unido a la superficie que utiliza un primer oligonucleótido que genera una superficie y una segunda superficie oligonucleótida de anclaje.
- La Figura 2 ilustra un método ejemplar no limitante de la síntesis de ácido nucleico unido a la superficie que utiliza una única superficie que comprende un oligonucleótido que genera secuencias y secuencias de anclaje.
- La Figura 3 ilustra un método ejemplar no limitante de la síntesis de ácido nucleico unido a la superficie y la exploración de polinucleótidos ensamblados de longitud completa que utilizan una exonucleasa específica monocatenaria.
- 10 La Figura 4 ilustra un método ejemplar no limitante de la síntesis de ácido nucleico unido a la superficie y la exploración de polinucleótidos ensamblados de longitud completa que utilizan una regla molecular.
- La Figura 5 ilustra matrices de construcción ejemplares no limitantes y la matriz de anclaje que comprende oligonucleótidos unidos al soporte.
- 15 La Figura 6 ilustra un método no limitante para la síntesis de oligonucleótidos de construcción a partir de oligonucleótidos inmovilizados en matrices de construcción.
- La Figura 7 ilustra un método no limitante para la síntesis polinucleótida unida a la superficie altamente paralela secuencial.
- La Figura 8 ilustra un conjunto de matrices de construcción y una matriz de anclaje.
- 20 La Figura 9 a-d ilustra un método no limitante para transferir un primer conjunto y un segundo conjunto de oligonucleótidos de construcción a partir de la matriz de construcción a la matriz de anclaje en un medio fluido.
- La Figura 10 ilustra un método no limitante para transferir oligonucleótidos de construcción a partir de la matriz de construcción a la matriz de anclaje en un medio fluido en presencia de una membrana porosa.
- La Figura 11 ilustra un método no limitante para transferir dos oligonucleótidos de construcción diferentes a partir de la matriz de construcción en la matriz de anclaje en un medio fluido y en presencia de una ligasa.
- 25 La Figura 12 ilustra un método no limitante para transferir dos oligonucleótidos de construcción diferentes a partir de la matriz de construcción a la matriz de anclaje en un medio fluido en el que el número de oligonucleótidos de construcción está en exceso esteoquímico para cada oligonucleótido de anclaje correspondiente.
- La Figura 13 ilustra un método no limitante para transferir un polinucleótido ensamblado a partir de una matriz de anclaje a aquellos que están en otra matriz de anclaje utilizando una unión de solapamiento entre los
- 30 polinucleótidos ensamblados en cada matriz de anclaje.
- La Figura 14 ilustra un método no limitante para eliminar el error de mal apareamiento a partir de secuencias de ácido nucleico bicatenario que utilizan una endonucleasa específica en el mal apareamiento. El nucleótido de mal apareamiento se indica mediante una cruz.

35 Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la tecnología proporcionados en el presente documento se utilizan aumentando la precisión, el rendimiento, la producción, y/o la rentabilidad de síntesis del ácido nucleico y las reacciones de ensamblaje. Como se utiliza en el presente documento, el término "ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido" se utiliza de forma intercambiable y se refiere a formas poliméricas de origen natural o sintéticas de nucleótidos. Los oligonucleótidos y las moléculas de ácidos nucleicos pueden formarse a partir de nucleótidos de origen natural, por ejemplo formando moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Alternativamente, los oligonucleótidos de origen natural pueden incluir modificaciones estructurales para alterar sus propiedades, tales como ácidos peptidonucleicos (APN) o en ácidos nucleicos bloqueados (ANB). La síntesis de fase sólida de oligonucleótidos y moléculas de ácido nucleico con bases de origen natural o artificial se conocen bien en la materia. El término ha de entenderse para incluir equivalentes, análogos de ARN o ADN fabricados a partir de análogos nucleótidos y cuando proceda a la realización que se está describiendo, polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios. Los nucleótidos útiles en la invención incluyen, por ejemplo, nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos), o modificaciones naturales o sintéticas de nucleótidos, o bases artificiales. Como se utiliza en el presente documento, el término monómero se refiere a un miembro de un conjunto de moléculas pequeñas que son y pueden unirse entre sí para formar un oligómero, un polímero o un compuesto compuesto de dos o más miembros. El orden particular de monómeros en un polímero se refiere en el presente documento como la "secuencia" del polímero. El conjunto de monómeros incluye, pero no se limita a, por ejemplo, el conjunto de L-aminoácidos comunes, el conjunto de D-aminoácidos, el conjunto de aminoácidos sintéticos y/o naturales, el conjunto de nucleótidos y el conjunto de pentosas y hexosas. Los aspectos de la invención se describen en el presente documento principalmente respecto a la preparación de oligonucleótidos, pero se podría aplicar fácilmente en la preparación de otros polímeros tales como péptidos o polipéptidos, polisacáridos, fosfolípidos, heteropolímeros, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliámidas, polietileneiminas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, poliimididas, poliacetatos, o cualquier otro polímero.

Como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia predeterminada" o "secuencia predefinida" se utiliza de forma intercambiable y significa que la secuencia del polímero se conoce y se elige antes de la síntesis o ensamblaje del polímero. En particular, los aspectos de la invención se describen en el presente documento principalmente respecto a la preparación de moléculas de ácido nucleico, siendo conocida y elegida la secuencia de los ácidos nucleicos antes de la síntesis o ensamblaje de las moléculas de ácido nucleico. En algunas realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se utilizan oligonucleótidos o polinucleótidos

inmovilizados como una fuente de material. En diversas realizaciones, los métodos que se describen en el presente documento utilizan oligonucleótidos, sus secuencias se determinan basándose en la secuencia de los constructos polinucleótidos que se van a sintetizar. En una realización, los oligonucleótidos son moléculas de ácido nucleico corto. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden ser de 10 a aproximadamente 300 nucleótidos, de 20 a aproximadamente 400 nucleótidos, de 30 a aproximadamente 500 nucleótidos, de 40 a aproximadamente 600 nucleótidos, o más de aproximadamente 600 nucleótidos de longitud. Sin embargo, pueden utilizarse oligonucleótidos más cortos o más largos. Los oligonucleótidos pueden diseñarse para tener una longitud diferente. En algunas realizaciones, la secuencia del constructo polinucleótido puede dividirse en una pluralidad de secuencias más cortas que se pueden sintetizar en paralelo y ensamblarse en un único o una pluralidad de constructos polinucleótidos deseados utilizando los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el procedimiento de ensamblaje puede incluir varias etapas de reacción paralela y/o secuencial en las que se sintetiza o se inmoviliza, se extiende, y se combina una pluralidad de ácidos nucleicos o oligonucleótidos diferentes en el cebador para ensamblarse (por ejemplo, mediante extensión o ligamiento como se describe en el presente documento) para generar un producto de ácido nucleico más largo que se va a utilizar para el ensamblaje, clonación u otras aplicaciones adicionales.

En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos de bibliotecas de ensamblaje que contienen ácidos nucleicos que tienen variaciones de secuencia. Las estrategias de ensamblaje proporcionadas en el presente documento pueden utilizarse para generar bibliotecas muy grandes representativas de diferentes secuencias de ácido nucleico de interés. En algunas realizaciones, las bibliotecas de ácidos nucleicos son bibliotecas de variantes de secuencia. Las variantes de secuencia pueden ser variantes de una secuencia codificadora de la proteína de origen natural. Sin embargo, en algunas realizaciones, las variantes de secuencia pueden ser variantes de una pluralidad de secuencias codificadoras de proteína diferentes. Por consiguiente, un aspecto de la tecnología proporcionado en el presente documento se refiere al ensamblaje de bibliotecas precisas de ácido nucleico de alta densidad. Los aspectos de la tecnología proporcionados en el presente documento proporcionan también bibliotecas precisas de ácido nucleico de alta densidad. Una biblioteca de ácido nucleico de alta densidad puede incluir más de 100 variantes de secuencia diferentes (por ejemplo, aproximadamente 10^2 a 10^3 ; aproximadamente 10^3 a 10^4 ; aproximadamente 10^4 a 10^5 ; aproximadamente 10^5 a 10^6 ; aproximadamente 10^6 a 10^7 ; aproximadamente 10^7 a 10^8 ; aproximadamente 10^8 a 10^9 ; aproximadamente 10^9 a 10^{10} ; aproximadamente 10^{10} a 10^{11} ; aproximadamente 10^{11} a 10^{12} ; aproximadamente 10^{12} a 10^{13} ; aproximadamente 10^{13} a 10^{14} ; aproximadamente 10^{14} a 10^{15} ; o más secuencias diferentes) en las que un alto porcentaje de secuencias diferentes son secuencias especificadas a diferencia de las secuencias aleatorias (por ejemplo, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de las secuencias son secuencias predeterminadas de interés).

En algunas realizaciones, los métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento utilizan oligonucleótidos que se inmovilizan en una superficie o sustrato (por ejemplo, oligonucleótidos unidos al soporte). Los oligonucleótidos unidos al soporte comprenden por ejemplo, oligonucleótidos complementarios a oligonucleótidos de construcción, oligonucleótidos de anclaje y/o oligonucleótidos separadores. Como se utiliza en el presente documento, el término "soporte", "sustrato" y "superficie" se utiliza de forma intercambiable y se refiere a un material insoluble disolvente poroso o no poroso en el que se sintetizan o inmovilizan polímeros tales como ácidos nucleicos. Como se utiliza en el presente documento "poroso" significa que el material contiene poros que tienen diámetros sustancialmente uniformes (por ejemplo en el intervalo nm). Los materiales porosos incluyen papel, filtros sintéticos etc. En tales materiales porosos, la reacción puede tener lugar en los poros. El soporte puede tener cualquier número de formas, tales como perno, tira, placa, disco, varilla, curvas, estructura cilíndrica, partículas, incluyendo perlas, nanopartículas y similares. El soporte puede tener anchuras variables. El soporte puede ser hidrófilo o capaz de volver a ser hidrófilo e incluye polvos inorgánicos tales como sílice, sulfato de magnesio, y alúmina; materiales poliméricos naturales, materiales particularmente celulósicos y materiales obtenidos a partir de celulosa, tales como fibras que contienen papeles, por ejemplo, papel de filtro, papel de cromatografía, etc.; polímeros de origen natural sintéticos o modificados, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida, dextrano reticulado, agarosa, poli(acrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metil-buteno), poliestireno, polimetacrilato, polietilentereftalato), nylon, poli(butirato de vinilo), membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), vidrio, vidrio poroso controlado, vidrio poroso controlado magnético, cerámica, metales, y similares, etc.; utilizados por sí mismos o junto con otros materiales. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se sintetizan en un formato de matriz. Por ejemplo, los oligonucleótidos monocatenarios se sintetizan *in situ* en un soporte común, en el que cada oligonucleótido se sintetiza en una característica separada o discreta (o mancha) en el sustrato. En realizaciones preferentes, los oligonucleótidos monocatenarios se unen a la superficie del soporte o característica. Como se utiliza en el presente documento, el término "matriz" se refiere a una disposición de características discretas para el almacenamiento, amplificación y liberación de oligonucleótidos u oligonucleótidos complementarios para reacciones adicionales. En una realización preferente, el soporte o matriz es direccionable: el soporte incluye dos o más características direccionables discretas en una ubicación predeterminada particular (es decir, una "dirección") en el soporte. Por lo tanto, cada molécula oligonucleótida en la matriz se localiza en una ubicación conocida y definida en el soporte. La secuencia de cada oligonucleótido se puede determinar a partir de su

posición en el soporte. La matriz puede comprender regiones intercaracterísticas. Las intercaracterísticas no pueden transportar cualquier oligonucleótido a su superficie y pueden corresponder a un espacio inerte.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se unen, se depositan, se inmovilizan, se unen a la superficie, se apoyan o se sintetizan en las características discretas de la superficie o matriz. Los oligonucleótidos se pueden unir de forma covalente a la superficie o depositarse en la superficie. Las matrices se pueden construir, ordenar o comprar de forma personalizada de un proveedor (por ejemplo, Agilent, Affymetrix, Nimblegen). Diversos métodos de construcción se conocen bien en la materia, por ejemplo sintetizadores de matriz sin máscara, métodos dirigidos por haz de luz utilizando máscaras, métodos microfluídicos, métodos de depositado, etc. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de construcción y/o selección pueden sintetizarse en un soporte sólido utilizando un sintetizador de matriz sin máscara (MAS). Los sintetizadores de matriz sin máscara se describen, por ejemplo, en la Solicitud PCT N° WO 99/42813 y en la Patente de Estados Unidos N° 6.375.903 correspondiente. Se conocen otros ejemplos de instrumentos sin máscara que pueden fabricar una micromatriz de ADN personalizado en la que cada una de las características en la matriz tiene una molécula de ADN monocatenaria de la secuencia deseada. Otros métodos para sintetizar oligonucleótidos incluyen, por ejemplo, métodos dirigidos por haz de luz que utilizan máscaras, métodos microfluídicos, métodos de depositado, métodos basados en pernos, y métodos que utilizan múltiples soportes. Se describen métodos dirigidos por haz de luz que utilizan máscaras (por ejemplo, métodos de VLSIPS™) para la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.143.854, 5.510.270 y 5.527.681. Estos métodos implican la activación de regiones predefinidas de un soporte sólido y tras el contacto del soporte con una solución monómera preseleccionada. Las regiones seleccionadas pueden activarse mediante irradiación con una fuente de haz de luz a través de una máscara del mismo modo que las técnicas de fotolitografía utilizadas en la fabricación de un circuito integrado. Otras regiones del soporte permanecen inactivas debido a que se bloquea la iluminación mediante la máscara y permanecen químicamente protegidas. Por consiguiente, un patrón de luz define qué regiones del soporte reaccionan con un monómero dado. Mediante la activación repetida de diferentes conjuntos de regiones predefinidas y en contacto con soluciones monómeras diferentes con el soporte, se produce una matriz diversa de polímeros en el soporte. Se pueden utilizar opcionalmente otras etapas, tales como el lavado de la solución monómera sin reaccionar del soporte. Otros métodos aplicables incluyen técnicas mecánicas tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 5.384.261. Se describen métodos adicionales aplicables a la síntesis de oligonucleótidos en un único soporte, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.384.261. Por ejemplo, se pueden administrar reactivos al soporte mediante (1) flujo en un canal definido en regiones predeterminadas o (2) "depositado" en las regiones predefinidas. Se pueden emplear también otros enfoques, así como combinaciones de depositado y flujo. En cada ejemplo, algunas regiones activadas del soporte se separan mecánicamente de otras regiones cuando se administran las soluciones monómeras a los diversos sitios de reacción. Los métodos microfluídicos implican, por ejemplo, sistemas microfluídicos para controlar la síntesis de oligonucleótidos en un soporte sólido. Por ejemplo, las diversas secuencias polímeras pueden sintetizarse en regiones seleccionadas de un soporte sólido al formar microfluidos en una superficie del soporte a través del cual fluyen reactivos apropiados o en el que se colocan reactivos apropiados. Los métodos de depositado para preparar oligonucleótidos en un soporte sólido implican la administración de reactivos en cantidades relativamente pequeñas al depositarlos directamente en las regiones seleccionadas. En algunas etapas, se puede pulverizar toda la superficie de soporte o de otro modo recubrirse con una solución, si es más eficiente hacerlo de ese modo. Se pueden depositar gota a gota alícuotas medidas de manera precisa mediante un dispensador que se desplaza de región en región. Se describen métodos basados en pernos, para la síntesis de oligonucleótidos en un soporte sólido, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.288.514. Los métodos basados en pernos, utilizan un soporte que tiene una pluralidad de pernos u otras extensiones. Los pernos se insertan cada uno de manera simultánea en recipientes de reactivos individuales en una bandeja. Se utiliza de forma habitual una matriz de 96 pernos con una bandeja de 96 recipientes tales como una placa de microtitulación de 96 pocillos. Cada bandeja se rellena con un reactivo particular para acoplar una reacción química particular en un perno individual. Por consiguiente, las bandejas contendrán a menudo reactivos diferentes. Puesto que se han optimizado las reacciones químicas de tal manera que cada una de las reacciones puede realizarse en un conjunto relativamente similar de condiciones de reacción, es posible llevar a cabo etapas múltiples de acoplamiento químico de manera simultánea.

En otra realización, se puede sintetizar o inmovilizar una pluralidad de oligonucleótidos en soportes múltiples. Un ejemplo es un método de síntesis basado en perlas que se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.770.358; 5.639.603; y 5.541.061. Para la síntesis de moléculas tales como oligonucleótidos en perlas, se suspende una gran pluralidad de perlas en un portador adecuado (tal como agua) en un recipiente. Las perlas se proporcionan con moléculas opcionales separadas que tienen un sitio activo en el que se compleja, opcionalmente, un grupo protector. En cada etapa de la síntesis, las perlas se dividen para acoplarse a una pluralidad de recipientes. Tras desproteger las cadenas oligonucleótidas emergentes, se añade una solución monómera diferente a cada recipiente, de modo que en todas las perlas en un recipiente dado, se produzca la misma reacción de adición de nucleótidos. Las perlas se lavan después con reactivos en exceso, se agrupan en un único recipiente, se mezclan y se vuelven a distribuir en otra pluralidad de recipientes en preparación para la siguiente ronda de síntesis. Cabe señalar que en virtud del gran número de perlas utilizadas al comienzo, habrá de forma similar un gran número de perlas dispersas al azar en el recipiente, teniendo cada una, una secuencia única oligonucleótida sintetizada en su superficie tras numerosas rondas de adición de bases al azar. Una perla individual puede etiquetarse con una secuencia que es única al oligonucleótido bicatenario en el mismo, para permitir la identificación durante su uso.

Las secuencias oligonucleótidas y/o polinucleótidas presintetizadas pueden unirse a un soporte o sintetizarse *in situ*

- utilizando métodos dirigidos por haz de luz, métodos microfluídicos y depositados, métodos de inyección de tinta, métodos basados en pernos, y métodos basados en perlas expuestos en las siguientes referencias: McGall *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:13555; *Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering*, Vol. 20:111, Plenum Press (1998); Duggan *et al.* (1999) Nat. Genet. S21:10; *Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics*, Cambridge University Press, 2003; Publicación de la Solicitud de la Patente de Estados Unidos N° 2003/0068633 y 2002/0081582; Patente de Estados Unidos N° 6.833.450, 6.830.890, 6.824.866, 6.800.439, 6.375.903 y 5.700.637; y las Publicaciones PCT N° WO 04/031399, WO 04/031351, WO 04/029586, WO 03/100012, WO 03/066212, WO 03/065038, WO 03/064699, WO 03/064027, WO 03/064026, WO 03/046223, WO 03/040410 y WO 02/24597. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos presintetizados se unen a un soporte o se sintetizan utilizando una metodología de depositado en la que las soluciones monómeras se depositan gota a gota por un dispensador que se desplaza de región en región (por ejemplo, inyección de tinta). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se depositan en un soporte utilizando, por ejemplo, un dispensador accionado por una onda mecánica.
- 15 En un aspecto, la invención se refiere a un método para producir polinucleótidos diana que tienen una secuencia predefinida en un soporte sólido. Los polinucleótidos sintéticos tienen al menos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, o 100 kilobases (kb), o 1 megabase (mb), o más largos. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para la producción de polinucleótidos de alta fidelidad. En realizaciones ejemplares, una composición de polinucleótidos sintéticos contiene al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, copias que están libres de errores (por ejemplo, con una secuencia que no se desvía de una secuencia predeterminada). El porcentaje de copias libres de errores está basado en el número de copias libres de errores en la composición en comparación con el número total de copias de polinucleótidos en la composición que se pretende que tenga la secuencia correcta, por ejemplo, predefinida o predeterminada.
- 25 En algunas realizaciones, la secuencia diana del ácido nucleico puede obtenerse en una única etapa mezclando todos los oligonucleótidos de solapamiento necesarios para formar el constructo polinucleótido que tiene la secuencia predefinida. Alternativamente, se puede realizar una serie de reacciones de ensamblaje en paralelo o en serie, de tal manera que los constructos polinucleótidos más grandes se ensamblan a partir de series de reacciones separadas de ensamblaje.
- 30 La divulgación se refiere al diseño de oligonucleótidos para el ensamblaje de polinucleótidos de alta fidelidad. La divulgación puede ser útil para aumentar la tasa de rendimiento de un procedimiento de ensamblaje de ácido nucleico y/o reducir el número de etapas o cantidades de reactivo utilizados para generar correctamente una secuencia de ácido nucleico ensamblado. En algunas realizaciones, los aspectos de la invención pueden ser útiles en el contexto del ensamblaje de ácido nucleico automatizado para reducir el tiempo, el número de etapas, la cantidad de reactivo, y otros factores requeridos para el ensamblaje de cada secuencia correcta de ácido nucleico. Por consiguiente, estos y otros aspectos de la invención pueden ser útiles para reducir el costo y el tiempo de uno o más procedimientos de ensamblaje de ácido nucleico.
- 40 Algunos aspectos de la invención se refieren a un proceso de ensamblaje de polinucleótidos en el que los oligonucleótidos sintéticos se diseñan y se utilizan como plantillas para las reacciones de extensión del cebador, síntesis de oligonucleótidos complementarios y para ensamblar polinucleótidos en constructos polinucleótidos más largos. En algunas realizaciones, el método incluye sintetizar una pluralidad de oligonucleótidos o polinucleótidos en una reacción de extensión de la cadena utilizando una primera pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios como plantillas. Como se ha señalado previamente, los oligonucleótidos pueden sintetizarse en primer lugar en una pluralidad de características discretas de la superficie, o pueden depositarse en la pluralidad de características del soporte. El soporte puede comprender al menos 100, al menos 1000, al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 características. En una realización preferente, los oligonucleótidos se inmovilizan en una superficie sólida. En una realización preferente, cada característica de la superficie sólida comprende una densidad elevada de oligonucleótidos que tiene una secuencia predeterminada diferente (por ejemplo, aproximadamente 10^6 - 10^8 moléculas por característica).
- 55 En algunas realizaciones, las pluralidades de diferentes oligonucleótidos monocatenarios se inmovilizan en diferentes características de un soporte sólido. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos unidos al soporte pueden unirse a través de su extremo 5'. En una realización preferente, los oligonucleótidos unidos al soporte se unen a través de su extremo 3'. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos unidos al soporte pueden inmovilizarse en el soporte mediante una secuencia (por ejemplo, deteriorando la secuencia de unión), enlazador o separador nucleótido (por ejemplo, enlazador de fotoescisión o enlazador químico). Cabe señalar que por extremo 3', significa la secuencia corriente abajo en el extremo 5' y por extremo 5' significa la secuencia corriente arriba en el extremo 3'. Por ejemplo, un oligonucleótido puede inmovilizarse en el soporte mediante una secuencia, enlazador o separador nucleótido que no se implica en la hibridación. La secuencia del extremo 3' del oligonucleótido unido al soporte se refiere entonces a una secuencia corriente arriba en el enlazador o separador.
- 65 En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden diseñarse para tener una secuencia que es idéntica o complementaria a una parte diferente de la secuencia de un polinucleótido diana predeterminado que se va a

ensamblar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, cada oligonucleótido puede tener una secuencia que es idéntica o complementaria a una parte de una o dos hebras de un ácido nucleico diana bicatenario. Como se utiliza en el presente documento, el término "complementario" se refiere a la capacidad para precisar el emparejamiento entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una posición dada de un ácido nucleico es capaz de unirse al hidrógeno con un nucleótido de un ácido nucleico, entonces los ácidos nucleicos se consideran complementarios entre sí en esa posición. La complementariedad entre dos moléculas de ácido nucleico monocatenario puede ser "parcial", en la que sólo se unen algunos de los nucleótidos, o puede ser completa cuando la complementariedad total exista entre las moléculas monocatenarias.

En algunas realizaciones, la pluralidad de oligonucleótidos de construcción se diseña de tal modo que cada pluralidad de oligonucleótidos de construcción comprende una región de secuencia en su extremo 5' que es complementaria a una región de secuencia del extremo 5' de otro oligonucleótido de construcción y una región de secuencia en su extremo 3' que es complementaria a una región de secuencia en su extremo 3' de un oligonucleótido de construcción diferente. Como se utiliza en el presente documento, un oligonucleótido de "construcción" se refiere a uno de la pluralidad o población de oligonucleótidos monocatenarios utilizados para el ensamblaje del polinucleótido. La pluralidad de oligonucleótidos de construcción comprende oligonucleótidos para hebras tanto sentido como antisentido del polinucleótido diana. Los oligonucleótidos de construcción pueden tener cualquier longitud, designándose la longitud para acomodar un solapamiento o secuencia complementaria. Los oligonucleótidos de construcción pueden tener idéntico tamaño o tamaños diferentes. En realizaciones preferentes, los oligonucleótidos de construcción abarcan la secuencia completa del polinucleótido diana sin espacios. En otras realizaciones, los oligonucleótidos de construcción se solapan parcialmente dando lugar a espacios entre los oligonucleótidos de construcción cuando se hibridan entre sí. Preferentemente, el grupo o población de oligonucleótidos de construcción comprende oligonucleótidos de construcción que tienen secuencias de solapamiento de modo que los oligonucleótidos de construcción pueden hibridarse entre sí en condiciones de hibridación apropiadas. Se apreciaría que cada construcción interna de oligonucleótidos se hibridara en dos oligonucleótidos de construcción diferentes mientras que los oligonucleótidos de construcción en su extremo 5' y/o 3' se hibridaran cada uno en un diferente(s) (o el(los) mismo(s)) oligonucleótido(s) interno(s). La hibridación y el ligamiento de oligonucleótidos de construcción de solapamiento darán lugar por tanto a un polinucleótido diana que tiene un saliente 3' y/o 5'. En otras realizaciones, el polinucleótido diana resultante puede comprender un extremo como en su extremo terminal 5' y/o 3'. En algunas realizaciones, si el polinucleótido diana se ensambla a partir de oligonucleótidos de construcción N, se diseñan 1 a pluralidades N de diferentes oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte de tal manera que la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción comprende en su extremo 5' una región de secuencia que es complementaria a una región de secuencia en el extremo 5' de un oligonucleótido de anclaje y en la que una pluralidad N de oligonucleótidos de construcción comprende en su extremo 3' una región de secuencia que es complementaria al extremo 3' de una región de secuencia del oligonucleótido de construcción (N-1). En algunas realizaciones, la primera pluralidad de oligonucleótidos tiene un extremo 5' que es complementario al extremo 5' de un oligonucleótido monocatenario de anclaje unido al soporte. Como se utiliza en el presente documento, el oligonucleótido de anclaje se refiere a un oligonucleótido diseñado que se va a complementar en al menos una parte del polinucleótido diana y puede inmovilizarse en el soporte. En una realización ejemplar, el oligonucleótido de anclaje tiene una secuencia complementaria al extremo 5' del polinucleótido diana y puede inmovilizarse en el soporte.

Debe tenerse en cuenta que los oligonucleótidos diferentes pueden diseñarse para tener longitudes diferentes con regiones de secuencias de solapamiento. Las regiones de secuencia de solapamiento pueden ser idénticas (es decir, correspondiente a la misma hebra del fragmento del ácido nucleico) o complementaria (es decir, correspondiente a hebras complementarias del fragmento de ácido nucleico). Las secuencias de solapamiento pueden tener cualquier longitud. Las secuencias de solapamiento pueden tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 500 nucleótidos de longitud (por ejemplo, entre aproximadamente 10 y 100, entre aproximadamente 10 y 75, entre aproximadamente 10 y 50, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, etc. nucleótidos de longitud). Sin embargo, pueden utilizarse longitudes de solapamiento más cortas, más largas o intermedias. Debe tenerse en cuenta que los solapamientos (regiones 5' o 3') entre diferentes ácidos nucleicos de entrada utilizados en una reacción de ensamblaje pueden tener diferentes longitudes. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos unidos al soporte de anclaje (o inmovilizados) incluyen regiones de secuencia que tienen regiones de solapamiento para ayudar en el ensamblaje de una secuencia de ácido nucleico predeterminado. En una realización preferente, los oligonucleótidos de anclaje incluyen regiones de secuencia que tienen regiones complementarias para hibridarse en un oligonucleótido diferente o en un polinucleótido (tal como, por ejemplo, un producto de subsensamblaje). Las regiones complementarias se refieren a una región de secuencia en un extremo 3' o un extremo 5' del oligonucleótido de plantilla inmovilizado (por ejemplo, oligonucleótido de plantilla). En una realización preferente, la región complementaria se localiza en el extremo 5' de los oligonucleótidos de anclaje. Las regiones complementarias se refieren a un extremo 3' o una región 5' de un primer oligonucleótido o polinucleótido que es capaz de hibridarse en un extremo 5' o extremo 3' de un segundo oligonucleótido o polinucleótido.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se ensamblan utilizando técnicas de ensamblaje basadas en una ligasa, en las que los oligonucleótidos se diseñan para proporcionar hebras sentido (hebra positiva) y antisentido (o hebra negativa) de longitud completa del constructo del polinucleótido diana. Después de la hibridación de los

oligonucleótidos sentido y antisentido, los oligonucleótidos en cada hebra se someten a ligamiento para formar el constructo del polinucleótido diana o un producto de subensamblaje. La referencia se realiza en la Patente de Estados Unidos Nº 5.942.609. Las técnicas de ensamblaje basadas en ligasa pueden implicar una o más enzimas ligasas adecuadas que pueden catalizar el enlace covalente de los extremos terminales de ácido nucleico 3' y 5' adyacentes (por ejemplo un fosfato 5' y un hidroxilo 3' de ácido(s) nucleico(s) hibridado(s) en un ácido nucleico de plantilla complementario, de manera que el extremo terminal 3' es adyacente de manera inmediata al extremo terminal 5'). Por consiguiente, una ligasa puede catalizar una reacción de ligamiento entre el fosfato 5' de un primer ácido nucleico al hidroxilo 3' de un segundo ácido nucleico si el primer y el segundo ácido nucleico se hibridan uno junto al otro en un ácido nucleico de plantilla. Una ligasa puede obtenerse a partir de fuentes recombinantes o naturales. Una ligasa puede ser una ligasa estable al calor. En algunas realizaciones, puede utilizarse una ligasa termoestable a partir de un organismo termófilo. Los ejemplos de ADN ligasas termoestables incluyen, pero no se limitan a: ADN ligasa Tth (de *Thermus thermophilus*, disponible en, por ejemplo, Eurogentec y GeneCraft); ADN ligasa Pfu (una ligasa hipertermófila de *Pyrococcus furiosus*); ligasa Taq (de *Thermus aquaticus*), Ampliigase® (disponible en Epicenter Biotechnologies), cualquier otra ligasa estable al calor adecuada, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, pueden utilizarse una o más ligasas de temperatura más baja (por ejemplo, ADN ligasa T4). Una ligasa de temperatura más baja puede ser útil para salientes más cortos (por ejemplo, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, o aproximadamente 6 salientes) que pueden no ser estables a temperaturas más altas.

Las técnicas no enzimáticas pueden utilizarse para ligar ácidos nucleicos. Por ejemplo, un extremo 5' (por ejemplo, el grupo fosfato 5') y un extremo 3' (por ejemplo, el hidroxilo 3') de uno o más ácidos nucleicos que pueden unirse de manera covalente entre sí sin utilizar enzimas (por ejemplo, sin utilizar una ligasa). En algunas realizaciones, las técnicas no enzimáticas pueden ofrecer ciertas ventajas sobre los ligamientos basados en enzimas. Por ejemplo, las técnicas no enzimáticas tienen una mayor tolerancia de análogos nucleótidos no naturales en sustratos de ácido nucleico, pueden utilizarse para ligar sustratos de ácido nucleico cortos, pueden utilizarse para ligar sustratos de ARN, y/o pueden ser más baratas y/o más adecuadas para ciertas aplicaciones automatizadas (por ejemplo, altos rendimientos).

El ligamiento no enzimático puede implicar un ligamiento químico. En algunas realizaciones, los extremos terminales de ácido nucleico de dos o más ácidos nucleicos diferentes pueden ligarse químicamente. En algunas realizaciones, los extremos terminales de ácido nucleico de un único ácido nucleico pueden ligarse químicamente (por ejemplo, para circularizar el ácido nucleico). Debe tenerse en cuenta que ambas hebras de un primer terminal de ácido nucleico bicatenario pueden ligarse químicamente a ambas hebras en un segundo terminal de ácido nucleico bicatenario. Sin embargo, en algunas realizaciones sólo puede ligarse químicamente una hebra de un primer terminal de ácido nucleico a una única hebra de un segundo terminal de ácido nucleico. Por ejemplo, el extremo 5' de una hebra de un primer terminal de ácido nucleico puede ligarse al extremo 3' de una hebra de un segundo terminal de ácido nucleico sin que los extremos de las hebras complementarias se ligan químicamente.

Por consiguiente, puede utilizarse un ligamiento químico para formar un enlace covalente entre un extremo terminal 5' de un primer extremo de ácido nucleico y un extremo terminal 3' de un segundo extremo de ácido nucleico, en el que el primer y segundo extremo de ácido nucleico pueden ser extremos de un único ácido nucleico o extremos de ácidos nucleicos separados. En un aspecto, el ligamiento químico puede implicar al menos un sustrato de ácido nucleico que tiene un extremo modificado (por ejemplo, extremos terminales 5' y/o 3' modificados) que incluyen uno o más restos reactivos químicamente que facilitan o favorecen la formación del enlace. En algunas realizaciones, el ligamiento químico se produce cuando uno o más extremos terminales de ácido nucleico se agrupan (por ejemplo, cuando los terminales se agrupan muy próximos debido a la hibridación entre secuencias de ácido nucleico complementarias). Por consiguiente, la hibridación entre salientes 3' o 5' complementarios (por ejemplo, los salientes generados por la escisión de la enzima de restricción de un ácido nucleico bicatenario) o entre cualquier combinación de ácidos nucleicos complementarios que dan lugar a un extremo terminal 3' que se agrupa muy próximo con un extremo terminal 5' (por ejemplo, los extremos terminales 3' y 5' son adyacentes entre sí cuando los ácidos nucleicos se hibridan a un ácido nucleico de plantilla complementario) puede favorecer un ligamiento químico dirigido a la plantilla. Los ejemplos de reacciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a, condiciones de condensación, reducción, y/o ligamiento fotoquímico. Debe tenerse en cuenta que en algunas realizaciones puede utilizarse el ligamiento químico para producir enlaces internucleótidos fosfodiéster de origen natural, enlaces internucleótidos de pirofosfato de fosfamida de origen natural, y/u otros enlaces internucleótidos de origen no natural.

En algunos aspectos de la invención, los oligonucleótidos se ensamblan por una extensión de cadena de la polimerasa. En algunas realizaciones, la primera etapa de reacción de extensión utiliza un cebador. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden comprender sitios de unión universal (común a todos los oligonucleótidos), semiuniversal (común a al menos parte de los oligonucleótidos) o individual o cebador único (específico para cada oligonucleótido) en el extremo 5' o el extremo 3' o ambos extremos. Como se utiliza en el presente documento, el término cebador "universal" o sitio de unión al cebador significa que una secuencia utilizada para amplificar los oligonucleótidos es común a todos los oligonucleótidos de modo que todos los oligonucleótidos de este tipo pueden amplificarse empleando un único conjunto de cebadores universales. En otras circunstancias, un oligonucleótido contiene un sitio de unión al cebador único. Como se utiliza en el presente documento, el término

"sitio de unión al cebador único" se refiere a un conjunto de secuencias de reconocimiento del cebador que amplifica selectivamente un subconjunto de oligonucleótidos. En otras circunstancias, un oligonucleótido contiene tanto secuencias de amplificación universales como únicas, que pueden utilizarse opcionalmente de manera secuencial. En una primera etapa, un cebador se añade y se hibrida a un oligonucleótido inmovilizado o unido al soporte. Por ejemplo, el cebador puede hibridarse a un oligonucleótido de anclaje inmovilizado. En algunas realizaciones, el cebador se diseña para complementarse a una secuencia de oligonucleótidos unidos al soporte o inmovilizados, denominada como sitio de unión al cebador. En la primera etapa, una solución que comprende una polimerasa, al menos un cebador y dNTPs, se añade a una característica del soporte sólido en condiciones que favorecen la extensión del cebador. Por ejemplo, haciendo referencia a la Figura 1, se añade un cebador (50) a una característica que comprende oligonucleótidos (1', 2', 3', y 4'). El cebador se hibrida al sitio de unión al cebador de los oligonucleótidos unidos al soporte y en condiciones que favorecen la extensión del cebador, el cebador se extiende en un oligonucleótido complementario (1, 2, 3, y 4) utilizando una secuencia de unión al soporte (1', 2', 3' o 4') como una plantilla.

En algunas realizaciones, puede utilizarse uracilo-ADN glicosilasa (UAG) para hidrolizar un enlace uracilo glicosídico en un ácido nucleico eliminando de este modo uracilo y creando un sitio básico sensible al álcali en el ADN que puede hidrolizarse posteriormente por el tratamiento con endonucleasa, calor o álcali. Como resultado, una parte de una hebra de un ácido nucleico bicatenario puede eliminarse exponiendo de este modo la secuencia complementaria en forma de un saliente monocatenario. Este enfoque requiere la incorporación deliberada de una o más bases uracilas en una hebra de un fragmento de ácido nucleico bicatenario. Esto puede conseguirse, por ejemplo, amplificando un fragmento de ácido nucleico utilizando un cebador de amplificación que contiene un uracilo de extremo terminal 3'. En algunas realizaciones, el cebador es un cebador que contiene uracilo múltiple (U). El cebador se hibrida en primer lugar a un oligonucleótido monocatenario unido al soporte y se extiende con la adición de dNTPs y una polimerasa apropiada en condiciones y temperatura apropiadas. En una etapa posterior, se puede eliminar el cebador. Después del tratamiento con UAG, puede eliminarse la región del cebador 5' en el uracilo (por ejemplo, hasta diluirse, incubarse, exponerse a condiciones de desnaturalización leves, etc.) exponiendo de este modo la secuencia complementaria como un saliente monocatenario. Debe tenerse en cuenta que la longitud del saliente puede determinarse por la posición del uracilo en el cebador de amplificación y por la longitud del cebador de amplificación. En algunas realizaciones, se utiliza una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII, tal como USER™ (reactivo de escisión específica en uracilo, New England Biolabs). UAG cataliza la escisión de una base de uracilo, formando un sitio abásico mientras deja intacto el segmento principal fosfodiéster. La actividad liasa de la endonucleasa VIII rompe el segmento principal fosfodiéster en los laterales 3' y 5' del sitio abásico de modo que se libera la desoxirribosa libre de base. En etapas posteriores, se puede eliminar el cebador.

Se debe tener en cuenta que las reacciones de extensión pueden tener lugar en un volumen único que abarca todas las características utilizadas que comprenden los oligonucleótidos unidos al soporte (1', 2', 3' y 4') o en cada etapa puede tener lugar en un microvolumen individual localizado que contiene sólo la(s) región(es) de interés para someterse a una etapa de extensión específica. En algunas realizaciones, la extensión y/o reacciones de ensamblaje se realizan en una microgota (véanse, la Solicitud PCT PCT/US2009/55267 y la Solicitud PCT PCT/US2010/055298, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

La extensión del cebador puede implicar una o más enzimas polimerasas adecuadas que pueden catalizar una extensión basada en plantilla de un ácido nucleico en una dirección 5' a 3' en presencia de nucleótidos adecuados y una plantilla hibridada. Una polimerasa puede ser termoestable. Puede obtenerse una polimerasa a partir de fuentes recombinantes o naturales. En algunas realizaciones, puede utilizarse una polimerasa termoestable de un organismo termófilo. En algunas realizaciones, una polimerasa puede incluir una actividad de corrección/exonucleasa 3'→5'. En algunas realizaciones, una polimerasa puede tener ninguna o poca actividad de corrección (por ejemplo, una polimerasa puede ser una variante recombinante de una polimerasa natural que se ha modificado para reducir su actividad de corrección). Los ejemplos de ADN polimerasas termoestables, incluyen, pero no se limitan a: Taq (una ADN polimerasa estable al calor de la bacteria *Thermus aquaticus*); Pfu (una ADN polimerasa termófila con una actividad de corrección/exonucleasa 3'→5' de *Pyrococcus furiosus*, disponible en por ejemplo Promega); ADN polimerasa de VentR® y ADN polimerasa (exo-) VentRO (ADN polimerasas termófilas con o sin actividad de corrección/exonucleasa 3'→5' de *Thermococcus litoralis*; también conocida como polimerasa Th); ADN polimerasa de Deep VentR® y ADN polimerasa (exo-) de Deep VentR® (ADN polimerasas termófilas con o sin actividad de corrección/exonucleasa 3'→5' de especies *Pyrococcus* GB-D; disponible en New England Biolabs); KOD HiFi (una ADN polimerasa KODI *Thermococcus kodakaraensis* recombinante con actividad de corrección/exonucleasa 3'→5', disponible en Novagen.); BIOX-ACT (una mezcla de polimerasas que posee actividad de ADN polimerasa 5'-3' y actividad de corrección 3'→5'); fragmento Klenow (un truncado en el extremo N-terminal de la ADN polimerasa I de *E. coli* que retiene la actividad de la polimerasa, aunque ha perdido la actividad exonucleasa 5'→3', disponible en, por ejemplo, Promega y NEB); Sequenase™ (polimerasa ADN de T7 deficiente en la actividad de la exonucleasa T-5'); Phi29 (ADN polimerasa del bacteriófago 29, puede utilizarse para la amplificación por círculo rodante, por ejemplo, en un kit de amplificación de plantillas para la secuenciación del ADN TempliPhi™, disponible en Amersham Biosciences); TopoTaq (una polimerasa híbrida que combina dominios de unión al ADN hiperestables y la actividad no relacionada al ADN de *Methanopyrus* topoisomerasa, sin actividad exonucleasa, disponible en Fidelity Systems); TopoTaq HiFi que incorpora un dominio de corrección con actividad exonucleasa; Phusion™ (una

enzima de tipo *Pyrococcus* con un dominio que mejora la capacidad de procesamiento, disponible en New England Biolabs); cualquier otra ADN polimerasa adecuada, o cualquier combinación de dos o más de las mismas. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una SDP (polimerasa con desplazamiento de la hebra), por ejemplo, una SDPe es una SDP sin actividad exonucleasa). Esto permite la PCR isotérmica (extensión isotérmica, 5
amplificación isotérmica) a una temperatura uniforme. Como la polimerasa (por ejemplo, Phi29, Bst) viaja a través de una plantilla, se desplaza la hebra complementaria (por ejemplo, creada en las reacciones de extensión previas). Como los ADN desplazados son monocatenarios, los cebadores pueden unirse a una temperatura constante, eliminando la necesidad de cualquier termociclado durante la amplificación.

10 En algunas realizaciones, después de la extensión o amplificación, la polimerasa se puede desactivar para evitar la interferencia con las etapas posteriores. Una etapa de calentamiento (por ejemplo, alta temperatura) puede desnaturar y desactivar la mayoría de las enzimas que no son térmicamente estables. Las enzimas pueden desactivarse en presencia o ausencia de líquido. La desactivación por calor en un soporte seco puede tener la 15
ventaja de desactivar las enzimas sin ningún efecto perjudicial en los oligonucleótidos. En algunas realizaciones, puede utilizarse una versión estable no térmica de la PCR ADN polimerasa térmicamente estable, aunque la enzima se optimiza menos para la tasa de error y velocidad. Alternativamente, puede utilizarse ATPd epoxi para inactivar la enzima.

20 En una realización, se proporciona un soporte que comprende al menos una característica que tiene una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos a la superficie. Cada pluralidad de oligonucleótidos se une a una característica discreta del soporte, y la secuencia predefinida de cada pluralidad de oligonucleótidos unidos a la característica es diferente de la secuencia predefinida de los oligonucleótidos unidos a una característica diferente. Al menos se sintetiza una pluralidad de oligonucleótidos en una reacción de extensión de la cadena en una primera característica del soporte mediante la síntesis dependiente de la plantilla. En algunas realizaciones, el soporte o 25
matriz completos que contienen las características discretas se someten a termociclado, a condiciones de temperatura de hibridación, a condiciones de temperatura de fusión rigurosas, o condiciones de desnaturación de temperatura. Puede realizarse el calentamiento y enfriamiento del soporte en cualquier instrumento de ciclo térmico. En otras realizaciones, se someten una o más características discretas a condiciones de temperatura específicas (hibridación, extensión, lavado o fusión). El termociclado de las características independientes seleccionadas (separándose unas de otras) puede realizarse al calentar localmente al menos una característica discreta. Las características discretas pueden calentarse localmente mediante cualquier medio conocido en la materia. Por ejemplo, las características discretas pueden calentarse localmente utilizando una fuente de láser de energía que puede controlarse en una dimensión x-y precisa, modulando de este modo de forma individual la temperatura de una gota. En otro ejemplo, puede utilizarse la combinación de un láser de haz más amplio con una máscara para irradiar características específicas. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para controlar la temperatura en el soporte de manera que las reacciones enzimáticas pueden tener lugar en un soporte (PCR, ligamiento o cualquier otra reacción sensible a la temperatura). En algunas realizaciones, se utiliza un láser de barrido para controlar el termociclado en características discretas en el soporte sólido. La longitud de onda utilizada puede seleccionarse entre un amplio espectro (100 nm a 100000 nm, es decir, desde ultravioleta a infrarrojos). En algunas realizaciones, 40
las características que comprenden los oligonucleótidos comprenden un dispositivo de absorción óptico o indicador. En algunas realizaciones, el soporte sólido se enfría mediante la circulación de aire o líquido. La energía que se va a depositar puede calcularse basándose en el comportamiento de absorbancia. En algunas realizaciones, la temperatura de la gota puede modelarse utilizando termodinámica. La temperatura puede medirse mediante una LCD similar al material o a cualquier otra tecnología *in situ*. En otra realización, el soporte completo puede calentarse y enfriarse para permitir que tengan lugar las reacciones enzimáticas u otras reacciones sensibles a la temperatura. En algunas realizaciones, puede dirigirse una fuente de energía mediante una configuración de barrido para depositar la energía en diversos lugares en la superficie del soporte sólido que comprende moléculas unidas al soporte. Se puede añadir el material absorbente óptico en la superficie del soporte sólido. Puede utilizarse una fuente de energía óptica, tal como una lámpara de alta intensidad, láser, u otra fuente de energía electromagnética (incluyendo microondas). La temperatura de los diferentes sitios de reacción puede controlarse de forma independiente mediante el control de la energía depositada en cada una de las características. 45
50

Por ejemplo, puede utilizarse un dispositivo digital de microespejos (DMD) para controlar la temperatura. DMD es un modulador óptico espacial microfabricado. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 7.498.176. En algunas realizaciones, puede utilizarse un DMD para calentar exactamente manchas o gotas seleccionadas en el soporte sólido. El DMD puede ser un chip que tiene en su superficie, por ejemplo, varios cientos de miles hasta varios millones de espejos microscópicos dispuestos en una matriz que se corresponden a las manchas o gotas que se van a calentar. Los espejos pueden rotarse de forma individual (por ejemplo, ± 10 - 12°), a un estado activo o inactivo. En el estado activo, la luz de una fuente de luz (por ejemplo, una bombilla) se refleja en el soporte sólido para calentar las manchas o gotas seleccionadas. En el estado inactivo, la luz se dirige a otra parte (por ejemplo, en un disipador de calor). En algunas realizaciones, la matriz puede ser una matriz rectangular. En un ejemplo, el DMD puede consistir en una matriz de 1024X768 de microespejos anchos de 16 μ M. En otro ejemplo, el DMD puede consistir en una matriz de 1920X1080 de microespejos anchos de 10 μ M. También son posibles otras disposiciones de tamaños de matriz y anchuras de microespejos. Estos espejos pueden ser direccionables individualmente y se 60
65 pueden utilizar para crear cualquier patrón o disposición dados al calentar diferentes manchas en el soporte sólido. Las manchas también pueden calentarse a diferentes temperaturas, por ejemplo, proporcionando diferentes

longitudes de onda para manchas individuales, y/o controlando el tiempo de irradiación. En algunas realizaciones, el DMD puede dirigir la luz a las manchas seleccionadas y utilizarse para identificar, seleccionar, fusionar, y/o escindir cualquier oligonucleótido de elección.

5 La Figura 1 muestra un método ejemplar para preparar el polinucleótido que tiene una secuencia predeterminada en un sustrato o soporte sólido. En algunas realizaciones, los polinucleótidos pueden ensamblarse para sintetizar la secuencia de ácido nucleico final (por ejemplo, ácido nucleico diana). Haciendo referencia a la Figura 1(a), se muestra una matriz de ácido nucleico 10 que posee una disposición de características 20 en la que cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte 30. Preferentemente, los oligonucleótidos unidos al soporte se unen a través de su extremo 3. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte tienen aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, aproximadamente 100 nucleótidos de longitud o más. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos 30 comprenden además un sitio de cebador universal en el extremo 3' (por ejemplo, sitio de unión al cebador de 15 bases en el extremo 3) y una secuencia complementaria a un oligonucleótido de construcción (denominado también como componente básico, y designado como 1', 2', 3' etc.). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de construcción son contiguos entre sí y juntos componen o abarcan la secuencia del polinucleótido diana. En realizaciones preferentes, los oligonucleótidos de construcción abarcan la secuencia completa del polinucleótido diana sin espacios. En otras realizaciones, los oligonucleótidos de construcción se solapan parcialmente dando lugar a espacios entre los oligonucleótidos de construcción cuando se hibridan entre sí. Haciendo referencia a la Figura 1, el polinucleótido diana se ensambla a partir de una población de oligonucleótidos de construcción, los oligonucleótidos de construcción pares representan una hebra del polinucleótido diana bicatenario (por ejemplo, hebra positiva) y los números impares representan una hebra complementaria del polinucleótido diana bicatenario (por ejemplo, hebra negativa). Preferentemente, el grupo de oligonucleótidos de construcción comprende oligonucleótidos de construcción que tienen secuencias de solapamiento de modo que los oligonucleótidos de construcción pueden hibridarse entre sí en condiciones de hibridación apropiadas. Se apreciaría que cada oligonucleótido de construcción interna se hibridara en dos oligonucleótidos de construcción diferentes, mientras que los oligonucleótidos de construcción en el extremo terminal 5' y/o 3' se hibridaran cada uno a un diferente(s) (o el mismo) oligonucleótido(s) interno (s). Por lo tanto, la hibridación de los oligonucleótidos de construcción de solapamiento dará lugar a un polinucleótido diana que tiene un saliente 3' y/o 5'. En algunas realizaciones, el polinucleótido diana resultante puede comprender un extremo romo en su extremo terminal 5' y/o 3'. Los oligonucleótidos de construcción pueden ligarse posteriormente para formar un constructo de ácido nucleico bicatenario unido covalentemente (Figura 1 (d)) utilizando técnicas de ensamblaje de ligamiento conocidas en la materia.

Haciendo referencia a la Figura 1(b), al menos una característica en el soporte 10 que comprende los oligonucleótidos unidos al soporte se incubaba con un cebador 50. En una primera etapa, el cebador se hibrida en primer lugar con el oligonucleótido monocatenario inmovilizado y se extiende en presencia de polimerasa y dNTPs apropiados, en condiciones de extensión apropiadas, para formar oligonucleótidos de construcción 60 (denominados como 1, 2, 3, 4) que son complementarios a los oligonucleótidos unidos al soporte (1', 2' 3', 4'). En algunas realizaciones, el cebador es un cebador que contiene uracilo múltiple (U). En una etapa posterior, se elimina el cebador. Preferentemente, se añade una endonucleasa USER™ para digerir el cebador. La digestión de los cebadores puede tener lugar posteriormente en la etapa de extensión, generando de este modo un híbrido que comprende los oligonucleótidos de construcción hibridados en los oligonucleótidos unidos al soporte (por ejemplo, 1-1', 2-2' etc.). En otras realizaciones, la digestión de los cebadores se produce en solución después de la liberación de los oligonucleótidos de construcción en la solución (Figura 1c).

En una segunda etapa (Figura 1c), los productos de extensión recién sintetizados (oligonucleótidos de construcción 65: 1, 2, 3, y/o 4) se fusionan y se liberan del soporte 10. La disociación se puede realizar en paralelo o secuencialmente. Los oligonucleótidos de construcción pueden liberarse en solución. En una realización, la solución es un tampón que comprende 10 mM de Tris, 50 mM de cloruro de sodio, y 1 mM de EDTA. Se puede realizar la fusión de los duplexos aumentando la temperatura, por ejemplo, en la ubicación específica en la matriz, a una temperatura de fusión (por ejemplo, 95 °C). Alternativamente, el híbrido puede disociarse añadiendo una enzima capaz de separar los ácidos nucleicos bicatenarios. La enzima helicasa puede añadirse en una ubicación específica en la matriz. Las enzimas helicasa se conocen en la materia y han demostrado que desenrollan ADN a partir de una estructura bicatenaria a una estructura monocatenaria. El producto de extensión monocatenario se puede transferir a un segundo soporte 15 que comprende una primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte de anclaje, la primera pluralidad de secuencia oligonucleótida de anclaje comprende una secuencia parcialmente complementaria a un primer producto de extensión (por ejemplo, oligonucleótidos de construcción 1). Se deja hibridar el primer producto de extensión en condiciones apropiadas a la primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje. Se dejaron hibridar durante la misma reacción o posterior, los otros productos de extensión (o oligonucleótidos de construcción de solapamiento) en condiciones apropiadas a sus secuencias complementarias, formando de este modo una secuencia polinucleótida más larga.

Haciendo referencia a la Figura 1(d), los oligonucleótidos de construcción 65 pueden transferirse a una nueva superficie 15 que comprende un oligonucleótido unido al soporte de anclaje 40 que tiene una secuencia

complementaria al primer oligonucleótido de construcción (oligonucleótido de construcción 1). Los oligonucleótidos de construcción adicionales (oligonucleótidos de construcción 2, 3, 4, etc.) se diseñan para hibridarse entre sí a través de sus regiones de solapamiento, como se muestra, para formar un constructo de ácido nucleico más largo 70. En algunas realizaciones, el oligonucleótido unido al soporte de anclaje es preferentemente monocatenario. En algunas realizaciones, el oligonucleótido unido al soporte de anclaje comprende un extremo terminal 5' complementario al extremo terminal 5' de una primera pluralidad de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos de construcción adicionales que forman entre sí la secuencia polinucleótida comprenden extremos terminales 3' complementarios y se hibridan entre sí. La adición, Figura 1(d), muestra un ejemplo de oligonucleótidos que se ha diseñado para hibridarse entre sí para ensamblarse en un constructo de polinucleótido más largo construido en el oligonucleótido de anclaje 40. La ligasa 80 se introduce en la solución para ligar cada unión formando de esta manera un constructo polinucleótido más largo covalentemente unido 90 como se muestra en la Figura 1(e). Si se desea el último oligonucleótido en el ensamblaje (por ejemplo, oligonucleótido de construcción 4) puede marcarse con un marcador fluorescente para indicar que ha tenido lugar una construcción de longitud completa.

En ciertas realizaciones ejemplares, puede utilizarse un marcador detectable para detectar uno o más oligonucleótidos o polinucleótidos descritos en el presente documento. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen diversos restos radiactivos, enzimas, grupos prostéticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores bioluminiscentes, partículas de metal, pares de unión proteína-proteína, pares de unión proteína-anticuerpo y similares. Los ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, la proteína fluorescente amarilla (PFA), proteína verde fluorescente (PFV), proteína fluorescente cian (PFC), umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, ficoeritrina y similares. Los ejemplos de marcadores bioluminiscentes incluyen, pero no se limitan a, luciferasa (por ejemplo, bacteriana, luciérnaga, elaterideo y similares), luciferina, aequorina y similares. Los ejemplos de sistemas de enzima que tienen señales detectables visualmente incluyen, pero no se limitan a, galactosidasas, glucorimididasas, fosfatasas, peroxidasas, colinesterasas y similares. Los marcadores identificables también incluyen compuestos radiactivos como ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³H. Los marcadores identificables se disponen comercialmente a partir de varias fuentes.

En algunas realizaciones, el soporte comprende un conjunto de características que comprende oligonucleótidos unidos al soporte, complementarios a los oligonucleótidos de construcción y al menos una característica comprende un oligonucleótido unido al soporte de anclaje. El oligonucleótido de anclaje es preferentemente monocatenario y comprende una secuencia complementaria a una secuencia terminal del polinucleótido diana. Haciendo referencia a la Figura 2(a), se muestra una matriz de oligonucleótidos 110 que es similar a la descrita en la Figura 1, excepto que el soporte comprende, en la misma superficie, oligonucleótidos unidos al soporte 130, y oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte 140.

Haciendo referencia a la Figura 2(b), un cebador 150 se hibrida a los oligonucleótidos unidos al soporte 130 en condiciones de hibridación. En una primera etapa, el cebador se hibrida a un oligonucleótido monocatenario unido al soporte y se extiende con la adición de dNTPs y una polimerasa apropiada en condiciones y temperatura apropiadas, para formar oligonucleótidos de construcción 160 (oligonucleótidos de construcción 1, 2, 3, 4), que son complementarios a los oligonucleótidos unidos al soporte (1', 2' 3', 4'). En algunas realizaciones, el cebador es un cebador que contiene uracilo múltiple (U). En una etapa posterior, se elimina el cebador. Preferentemente, se añade una endonucleasa USER™ para digerir el cebador. La digestión de los cebadores puede tener lugar posteriormente en la etapa de extensión, generando de este modo un híbrido que comprende los oligonucleótidos de construcción hibridados a los oligonucleótidos unidos al soporte. En otras realizaciones, la digestión de los cebadores se produce en solución después de la liberación de los oligonucleótidos de construcción en la solución (165, Figura 2c).

En una segunda etapa (Figura 2c), los productos de extensión recién sintetizados (oligonucleótido de construcción 1, 2, 3, y/o 4) se fusionan y se liberan a partir de las características (oligonucleótidos de construcción 165). La disociación de los oligonucleótidos de construcción puede realizarse en paralelo o secuencialmente. Los oligonucleótidos de construcción 165 pueden liberarse en solución. Se puede realizar la fusión de los duplexos aumentando la temperatura a una temperatura de fusión (por ejemplo, 95 °C). Alternativamente, los duplexos pueden disociarse utilizando una enzima capaz de disociar los ácidos nucleicos bicatenarios, tales como una helicasa. Se deja hibridar el primer producto de extensión en condiciones apropiadas a la primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje y se dejan hibridar los otros productos de extensión (u oligonucleótidos de solapamiento) en condiciones apropiadas a sus secuencias complementarias.

Haciendo referencia a la Figura 2(d), los oligonucleótidos de construcción (65) pueden hibridarse a un oligonucleótido unido al soporte de anclaje 140 que tiene una secuencia complementaria al primer oligonucleótido de construcción (oligonucleótido de construcción 1). Los oligonucleótidos de construcción adicionales (2, 3, 4, etc.) se diseñan para hibridarse entre sí a través de sus regiones de solapamiento, como se muestra en la Figura 2, para formar un constructo de ácido nucleico más largo 170. En realizaciones preferentes, el oligonucleótido unido al soporte de anclaje es monocatenario. En algunas realizaciones, el oligonucleótido unido al soporte de anclaje comprende un extremo terminal 5' complementario al extremo terminal 5' de una primera pluralidad de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos de construcción adicionales que forman entre sí la secuencia polinucleótida comprenden extremos terminales complementarios 3' y se hibridan entre sí. La Figura 2(d), muestra un ejemplo de

oligonucleótidos que se ha diseñado para hibridarse entre sí para ensamblarse en un constructo de polinucleótidos más largos construido en el oligonucleótido de anclaje 140. La ligasa 180 se introduce en la solución para ligar cada unión formando de este modo un constructo polinucleótido más largo covalentemente unido 190 como se muestra en la Figura 2(e). Si se desea el último oligonucleótido en el ensamblaje (por ejemplo, oligonucleótido de construcción 4) puede marcarse con un marcador fluorescente para indicar que ha tenido lugar una construcción de longitud completa.

Los aspectos de la divulgación se refieren a la selección de polinucleótidos diana que tiene la secuencia predefinida y/o a la eliminación de productos de ensamblaje no deseados. Durante el ensamblaje de polinucleótidos a partir de oligonucleótidos, se pueden ensamblar productos no deseados, tales como polinucleótidos de longitud parcial, constructos truncados. Puede ser útil eliminar productos no deseados o polinucleótidos que no tienen la secuencia y/o longitud correctas. En algunas realizaciones, uno o más polinucleótidos ensamblados pueden secuenciarse para determinar si contienen la secuencia predeterminada o no. Este procedimiento permite identificar fragmentos con la secuencia correcta. En otras realizaciones, se pueden utilizar otras técnicas conocidas en la materia para eliminar el error que contiene los fragmentos de ácido nucleico.

Se proporcionan métodos para proteger selectivamente secuencias polinucleótidas diana de la digestión de exonucleasa facilitando de este modo la eliminación de los constructos indeseados. Se puede utilizar cualquier variedad de nucleasas que preferentemente digieren ácidos nucleicos monocatenarios. Las nucleasas adecuadas incluyen, por ejemplo, una exonucleasa 3' específica monocatenaria, una endonucleasa específica monocatenaria, una exonucleasa 5' específica monocatenaria, y similares. En ciertas realizaciones, la nucleasa comprende exonucleasa I de *E. coli*. En algunas realizaciones, la digestión de exonucleasa se realiza para digerir todas las secuencias no bicatenarias. Los métodos de selección se ilustran en la Figura 3. En una realización, el método de selección se aprovecha del saliente del extremo terminal 3' o 5' del producto ensamblado por completo. Se apreciará que la secuencia saliente monocatenaria (5' o 3') del producto ensamblado por completo corresponda a la secuencia del oligonucleótido terminal (por ejemplo, el oligonucleótido de construcción 4, como se representa en la Figura 3). En productos no deseados, la secuencia del saliente 3' o 5' monocatenaria tendrá una secuencia diferente del oligonucleótido terminal predefinido. Por ejemplo, como se representa en la Figura 3, los productos no deseados tienen un saliente libre que tiene el oligonucleótido de construcción 2, o 3 en lugar del oligonucleótido de construcción terminal 4. Como se utiliza en el presente documento, el término "oligonucleótido de construcción terminal" se refiere al oligonucleótido en la secuencia terminal del polinucleótido diana o saliente terminal. En algunas realizaciones, el oligonucleótido terminal corresponde al saliente monocatenario 3' o 5' del polinucleótido diana. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótido diana comprende al menos un primer oligonucleótido, y un oligonucleótido de construcción terminal, en la que el oligonucleótido de terminal se encuentra corriente abajo del primer oligonucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido diana comprende un primer oligonucleótido, un oligonucleótido terminal y al menos un oligonucleótido interno.

La Figura 3a-c ilustra el caso en el que se generan ensamblajes truncados o no deseados (72 y 74, Figura 3b), así como ensamblajes de longitud completa (70, Figura 3b). Para filtrar los ensamblajes no deseados, puede añadirse una estructura de horquilla de ácido nucleico u oligonucleótidos tallo-bucle 200 al producto ensamblado. El oligonucleótido tallo-bucle se diseña para hibridarse al saliente 5' o 3' y ligarse a los dos oligonucleótidos terminales presentes en el producto de ensamblaje de longitud completa 70. Además, el oligonucleótido tallo-bucle se diseña para no hibridarse o ligarse a los productos de truncamiento 72 y 74.

La estructura de tallo-bucle puede formarse mediante el diseño de los oligonucleótidos para tener secuencias complementarias dentro de su secuencia monocatenaria mediante la cual los pliegues monocatenarios vuelven sobre sí mismos para formar un tallo bicatenario y un bucle monocatenario. Preferentemente, el dominio de tallo bicatenario tiene al menos aproximadamente 2 pares de bases y el bucle monocatenario tiene al menos 3 nucleótidos. Preferentemente, el tallo comprende una región monocatenaria de solapamiento (3' o 5'), es decir, el tallo es un híbrido parcial. Por ejemplo, la longitud del saliente puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, a aproximadamente 20, a aproximadamente 50, etc. nucleótidos. En una realización ejemplar, la longitud del saliente del oligonucleótido tallo-bucle es complementaria al saliente monocatenario 5' o 3' del polinucleótido ensamblado por completo o polinucleótido diana.

Haciendo referencia a la Figura 3d, el oligonucleótido tallo-bucle se liga con el polinucleótido de longitud completa que tiene la secuencia predefinida. Haciendo referencia a la Figura 3e, la superficie de soporte se expone a una exonucleasa tal como una nucleasa 3'. En realizaciones preferentes, el oligonucleótido tallo-bucle sirve para proteger el saliente (saliente 3' o 5') del constructo polinucleótido de longitud completa 70. Los constructos no deseados (por ejemplo, constructos truncados), que no se hibridan/ligan a los oligonucleótidos de tallo-bucle son susceptibles a la digestión. Después de la etapa de digestión (Figura 3e), el oligonucleótido tallo-bucle puede escindirse en el constructo de longitud completa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el oligonucleótido tallo-bucle se diseña para comprender un sitio de restricción tipo II en la estructura del tallo del oligonucleótido tallo-bucle y el oligonucleótido tallo-bucle se escinde en la enzima de restricción del constructo de ácido nucleico (por ejemplo enzima de restricción tipo II). En otras realizaciones, el oligonucleótido tallo-bucle se diseña para comprender al menos un uracilo y el oligonucleótido tallo-bucle se escinde en el constructo de ácido nucleico utilizando una mezcla de uracilo-DNA glicosilasa (UDG) y una ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII o una enzima USER™. En algunas realizaciones, el

polinucleótido de longitud completa puede escindirse en la superficie. En algunas realizaciones, los sitios de restricción necesarios pueden incluirse específicamente en el diseño de la primera pluralidad de oligonucleótido y/o en el diseño de los oligonucleótidos de anclaje. En algunas realizaciones, el sitio de restricción es un sitio de restricción tipo II. En algunas realizaciones, el constructo de longitud completa puede amplificarse posteriormente.

5 En algunas realizaciones, la región 3' del oligonucleótido de anclaje comprende un sitio de enzima de restricción. En algunas realizaciones, los sitios de unión a cebadores/cebador pueden diseñarse para incluir un sitio de escisión de endonucleasa de restricción. En una realización ejemplar, un sitio de unión al cebador/cebadores contiene un sitio de unión y/o escisión para una endonucleasa de restricción tipo IIs. Una amplia variedad de endonucleasas de restricción que tienen sitios de unión y/o escisión específicos se dispone comercialmente, por ejemplo, en New England Biolabs (Beverly, Mass.). En diversas realizaciones, se pueden utilizar endonucleasas de restricción que producen salientes 3', salientes 5' o extremos romos. Cuando se utiliza una endonucleasa de restricción que produce un saliente, puede utilizarse una exonucleasa para producir extremos romos (por ejemplo, RecJ_i, exonucleasa I, exonucleasa T, nucleasa S₁, nucleasa P₁, nucleasa de frijol de oro, ADN polimerasa T4, nucleasa CEL I etc.). Alternativamente, los extremos adherentes formados por la endonucleasa de restricción específica pueden utilizarse para facilitar el ensamblaje de los subensamblajes en una disposición deseada. En una realización ejemplar, un sitio de unión al cebador/cebadores que contiene un sitio de unión y/o escisión para una endonucleasa de restricción tipo IIs puede utilizarse para eliminar el cebador temporal. El término "endonucleasa de restricción tipo IIs" se refiere a una endonucleasa de restricción que tiene una secuencia de reconocimiento no palindrómica y un sitio de escisión que se produce fuera del sitio de reconocimiento (por ejemplo, de 0 a aproximadamente 20 nucleótidos distales al sitio de reconocimiento). Las endonucleasas de restricción tipo IIs pueden crear una muesca en una molécula de ácido nucleico bicatenario o pueden crear una fisura bicatenaria que produce extremos romos o adherentes (por ejemplo, salientes, 5' o 3'). Los ejemplos de endonucleasas tipo IIs incluyen, por ejemplo, las enzimas que producen un saliente 3', tales como, por ejemplo, Bsr I, Bsm I, BstF5 I, BsrD I, Bt I, Mnl I, BciV I, Hph I, Mbo II, Eci I, Acu I, Bpm I, Mme I, BSax I, Bcg I, Bae I, Bfi I, TspDT I, TspGW I, Taq II, Eco57 I, Eco57M I, Gsu I, Ppi I y Psr I; las enzimas que producen un saliente 5', tales como, por ejemplo, Bsma I, Ple I, Fau I, Sap I, BspM I, SfaN I, Hga I, Bvb I, Fok I, BceA I, BsmF I, Ksp632 I, Eco31 I, Esp3 I, Aar I; y las enzimas que producen un extremo romo, tales como, por ejemplo, Mly I y Btr I. Las endonucleasas tipo IIs se disponen comercialmente y se conocen bien en la materia (New England Biolabs, Beverly, Mass.).

30 En otras realizaciones, los sitios de unión al cebador y/o cebadores comprenden al menos uracilo y el cebador se escinde utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII o una enzima USER™ según lo dispuesto en t.

35 En otras realizaciones, la selección de polinucleótidos diana se aprovecha del tamaño o longitud del polinucleótido diana deseado. La Figura 4 ilustra métodos para medir la longitud de un(os) constructo(s) de polinucleótidos en la superficie de una matriz y para seleccionar constructo(s) de polinucleótidos de longitud completa. Preferentemente, los métodos permiten la selección del constructo polinucleótido diana de longitud correcta de entre una distribución de longitudes de constructo de polinucleótido diferentes. Un experto en la materia apreciará que los procedimientos químicos de unión para los ácidos nucleicos a superficies de vidrio normalmente den lugar a la molécula de ácidos nucleicos en el espaciado molecular (d) que oscila de 1 a 15 nm, preferentemente de 2 a 8 nm, preferentemente de 5 a 7 nm. En algunas realizaciones, la distancia d es aproximadamente 6 nm. Haciendo referencia a la Figura 4b, puede prepararse una superficie 215 que tiene una primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje 240 y una segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje 242 inmovilizados en el soporte en la que la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje tienen una secuencia predefinida diferente. En algunas realizaciones, la primera y segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje se separa por una distancia predeterminada X. En algunas realizaciones, la distancia X puede fijarse y controlarse mezclando números iguales de primera y segunda molécula de anclaje con una tercera secuencia de oligonucleótido unido al soporte denominada como una secuencia separadora de oligonucleótido 245. En algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótido separadora se diseña para que no tenga secuencias complementarias con los oligonucleótidos de construcción. En algunas realizaciones, el oligonucleótido separador es monocatenario. En otras realizaciones, el oligonucleótido separador es bicatenario. En algunas realizaciones, la distancia X se fija utilizando la siguiente ecuación:

$$X \sim d \times (C[\text{separador}] / C[\text{anclaje 1} + \text{anclaje 2}])$$

55 en la que d es la distancia entre dos moléculas de ácido nucleico, C[separador] es la concentración del oligonucleótido separador, C[anclaje1+anclaje2] es la concentración de una mezcla de oligonucleótido de anclaje 1 y oligonucleótido de anclaje 2.

60 Haciendo referencia a la Figura 4, los oligonucleótidos de construcción 265 se sintetizan mediante la extensión del cebador utilizando oligonucleótidos unidos al soporte 230 como plantillas. En algunas realizaciones, un primer oligonucleótido de anclaje unido al soporte 240 se diseña para tener una secuencia complementaria en una primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción. Los oligonucleótidos de construcción 265 pueden hibridarse entre sí e hibridarse con el oligonucleótido de anclaje generando de este modo constructos de polinucleótido unido al soporte (270, 272, 273, 274, Figura 4b). Después de las reacciones de ensamblaje, algunos de estos constructos de

polinucleótidos (270) pueden ser polinucleótidos de longitud completa que tienen la secuencia predefinida, mientras que otros constructos de polinucleótidos (272, 273, 274) pueden ser más cortos que los constructos de polinucleótidos de longitud de completa. Teniendo en cuenta que los nucleótidos en un constructo de ácido nucleico se separan aproximadamente 0,33 nm 0,34 nm de separación, un constructo de ácido nucleico que comprende 1000 bases de nucleótidos (según una longitud de gen típico) tendrá aproximadamente 340 nm de longitud. En algunas realizaciones, un segundo oligonucleótido de anclaje unido al soporte 242 puede diseñarse de modo que pueda conectarse al extremo terminal o saliente 5' del constructo de ADN de longitud completa 270. Además, si la distancia X se fija para tener aproximadamente la longitud esperada del constructo de longitud completa entonces el extremo terminal o saliente 5' del constructo de longitud completa sólo debe unirse al segundo oligonucleótido de anclaje si a) el constructo de longitud completa tiene la secuencia correcta al final, y si b) el constructo de longitud completa tiene la longitud correcta (290, como se muestra en la Figura 4c). En algunas realizaciones, el primer anclaje 240 puede comprender un sitio de endonucleasa tipo II. El producto de longitud completa se puede escindir utilizando una endonucleasa de restricción tipo II que da lugar a un producto que se ancla en el extremo distal al segundo anclaje 242. En algunas realizaciones, la secuencia de anclaje comprende al menos un uracilo y el producto de longitud completa se escinde utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII o una enzima USER™.

Algunos aspectos de la invención se refieren a dispositivos y métodos que permiten un ensamblaje de oligonucleótidos unidos al soporte altamente paralelo. En algunas realizaciones, puede ensamblarse una matriz de polinucleótidos en una superficie mediante la adición secuencial de oligonucleótidos de solapamiento complementarios a una pluralidad de oligonucleótidos de anclaje. En realizaciones preferentes, una pluralidad de polinucleótidos que tienen diferentes secuencias predeterminadas se sintetiza en diferentes características de una matriz. Haciendo referencia a la Figura 5, se proporciona una matriz de anclaje 310 en la que cada característica de la matriz comprende un oligonucleótido de anclaje unido al soporte (340: A₀, B₀, C₀, D₀) como se ha descrito anteriormente. Cada oligonucleótido de anclaje puede ser monocatenario y puede comprender en su extremo terminal 5' una secuencia complementaria al extremo terminal 5' de una primera pluralidad de oligonucleótidos. Debe tenerse en cuenta que, para la síntesis altamente paralela de diferentes polinucleótidos, cada pluralidad de oligonucleótidos de anclaje en cada función necesita tener una secuencia complementaria al extremo 5' de la secuencia de polinucleótido predeterminada que se va a sintetizar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la matriz de anclaje comprende diferentes poblaciones de oligonucleótidos de anclaje en diferentes características de la matriz, cada población o pluralidad de oligonucleótidos de anclaje tiene una secuencia terminal 5' diferente. Adicionalmente, se pueden proporcionar dos o más matrices de construcción (311, 312, y 315), en las que las matrices de construcción comprenden una pluralidad de características, cada característica comprende una población diferente de oligonucleótidos unidos al soporte (A_n, B_n, C_n, D_n) que tiene una secuencia predefinida. Debe tenerse en cuenta que, en algunas realizaciones, cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte que tienen una secuencia predeterminada diferente a la secuencia de la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte de otra característica en la misma superficie. Las secuencias de oligonucleótidos pueden diferir en una o más bases. Haciendo referencia la Figura 5, la primera matriz 311 comprende una primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte 331 (A₁', B₁', C₁', D₁'), en la que la parte de la secuencia de cada una de la primera pluralidad de oligonucleótidos es idéntica al extremo 5' de los oligonucleótidos de anclaje 314 unidos a una característica de la matriz de anclaje. La segunda matriz 312 comprende una segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte 332 (A₂', B₂' D₂' C₂'), en el que el extremo 5' de cada una de la segunda pluralidad de oligonucleótidos es complementario al extremo 5' de una primera pluralidad de oligonucleótidos 331. Se debe apreciar que en función de la secuencia de polinucleótidos y la longitud que se van a ensamblar, pueden proporcionarse una o más (por ejemplo, m) matrices adicionales, cada matriz comprende una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte (A'_{m-1}, B'_{m-1}, C'_{m-1}, D'_{m-1}) que tiene un extremo 5' libre complementario al extremo 5' de otra pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte 335 (A'_m, B'_m, C'_m, D'_m). En algunas realizaciones, se proporciona cada pluralidad de oligonucleótidos complementarios en un soporte diferente.

Haciendo referencia a la Figura 6, se genera una primera pluralidad de oligonucleótidos complementarios (oligonucleótidos de construcción A₁, B₁, C₁, D₁) utilizando la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte 331 (A₁', B₁', C₁', D₁') como plantillas. En algunas realizaciones, se incuban uno o más oligonucleótidos unidos al soporte con un cebador en presencia de una polimerasa en condiciones que favorecen la extensión del cebador. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte 331 (A₁', B₁', C₁', D₁') tiene en su extremo 3' una secuencia diseñada para ser complementaria a la secuencia del cebador (por ejemplo, sitio de unión al cebador). En algunas realizaciones, el cebador es un cebador que contiene uracilo múltiple y después de la extensión, el cebador se elimina utilizando una endonucleasa USER™ como se describe en el presente documento. Del mismo modo, se pueden sintetizar los oligonucleótidos de construcción A₂, B₂, C₂, D₂ y A_m, B_m, C_m, D_m de forma paralela o secuencial, generando de este modo oligonucleótidos bicatenarios unidos al soporte (por ejemplo, 361: A₁A₁', etc.).

Como se muestra en la Figura 7, los oligonucleótidos de construcción pueden liberarse de la matriz de construcción. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de construcción se liberan en condiciones que favorecen la disociación de los duplexos (por ejemplo, en temperaturas de fusión o en presencia de una helicasa según lo establecido en el presente documento). La Figura 7 ilustra la síntesis paralela de una pluralidad de polinucleótidos que tienen diferentes secuencias predeterminadas por la adición secuencial de oligonucleótidos de construcción de

solapamiento complementarios. Haciendo referencia a la Figura 7a, un primer conjunto de oligonucleótidos de construcción diferentes 371 (A_1, B_1, C_1, D_1) se liberan de la matriz de construcción 311. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de construcción se transfieren y se hibridan en una matriz de anclaje 310 que comprende oligonucleótidos de anclaje (A_0, B_0, C_0, D_0) que tienen en su extremo 5' una secuencia complementaria a la secuencia en el extremo 5' del primer conjunto de oligonucleótidos de construcción 371, formando de este modo duplexos 381 (por ejemplo $A_0A_1, B_0B_1, C_0C_1, D_0D_1$). En realizaciones preferentes, la primera pluralidad de duplexos comprende un saliente 3' libre. Como se ilustra en la Figura 7b, una segunda población de oligonucleótidos de construcción diferentes 372 (A_2, B_2, C_2, D_2) que tiene en un extremo una secuencia complementaria a la primera pluralidad del saliente híbrido se libera de la matriz de construcción 312. La segunda población se hibrida en el saliente 3' libre de los duplexos de los oligonucleótidos de construcción del primer anclaje 381 unidos a la matriz de anclaje 310 para formar duplexos 382 ($A_0A_1A_2, B_0B_1B_2, C_0C_1C_2, D_0D_1D_2$). En algunas realizaciones, la segunda pluralidad de duplexos comprende un saliente libre 5'. En algunas realizaciones, una tercera población de oligonucleótidos de construcción diseñada para tener una secuencia complementaria al saliente libre 5' se hibrida al saliente libre 5' de la segunda pluralidad de duplexos. Tal proceso puede repetirse con los oligonucleótidos de construcción adicionales generados y liberados de matrices de construcción hasta la longitud y la secuencia deseadas de cada polinucleótido que se ha sintetizado. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de construcción interna se diseñan para tener una región de secuencia en su extremo 3' complementario a la región de secuencia en el extremo 3' de un siguiente oligonucleótido de construcción interna. En algunas realizaciones, cada población de oligonucleótidos de construcción se sintetiza a partir de diferentes matrices de construcción y se diseña para hibridarse entre sí para ensamblarse en un polinucleótido más largo que tiene una secuencia predefinida. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de construcción correspondiente al extremo 5' del polinucleótido deseado tiene una secuencia complementaria a un oligonucleótido de anclaje unido al soporte. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de construcción se unen utilizando una ligasa. En algunas realizaciones, cada oligonucleótido de construcción se hibrida a un saliente y se pueden ligar los oligonucleótidos de construcción que definen una hebra del polinucleótido diana bicatenario. Los oligonucleótidos de construcción se pueden ligar después de cada adición secuencial de un oligonucleótido de construcción o se pueden ligar una vez que los oligonucleótidos de construcción se hayan hibridado entre sí para formar el polinucleótido de longitud completa.

En algunos aspectos de la invención, los oligonucleótidos de construcción se transfieren secuencialmente a partir de una matriz de construcción a una matriz de anclaje de manera altamente paralela. En algunas realizaciones, una pluralidad de polinucleótidos se ensambla en una matriz de anclaje mediante el alineamiento, la transferencia y la adición secuencial de oligonucleótidos de solapamiento complementarios a una pluralidad de oligonucleótidos de anclaje. En algunas realizaciones, la matriz de construcción y la matriz de anclaje se agrupan muy próximas para permitir la transferencia de oligonucleótidos de construcción de la matriz de construcción a la matriz de anclaje. Preferentemente, la matriz de construcción se agrupa sustancialmente en una distancia comparable o una distancia menor que la distancia entre dos conjuntos de oligonucleótidos (A_1, B_1 etc.). En algunas realizaciones, la distancia entre la matriz de construcción y la matriz de anclaje es de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 1000 μm . Las distancias deseadas dentro de este intervalo se logran, en algunas realizaciones, utilizando una dilución de esferas separadoras (por ejemplo, disponibles en Cospheric Microspheres) en una monocapa que mantiene las dos matrices separadas bajo compresión. En otras realizaciones, las membranas de silicona, por ejemplo polidimetilsiloxano (PDMS), se fabrican para abarcar una de las matrices en una cámara delgada que se cierra hasta unir la segunda matriz a la altura de la membrana. En otras realizaciones, una matriz puede flotar en la parte superior de la otra utilizando el medio líquido por sí misma como un separador. Por ejemplo, pueden utilizarse 100 μl de medio fluido o solución que tiene un grosor de aproximadamente 50 micras cuando se extiende de manera uniforme en un microscopio convencional.

En algunas realizaciones, la pluralidad de oligonucleótidos de construcción se sintetiza sobre al menos una matriz como se ha descrito previamente. Haciendo referencia a la Figura 8, una pluralidad de oligonucleótidos de construcción se sintetiza en características seleccionadas de al menos una matriz de construcción (por ejemplo, superficie 411), cada pluralidad de oligonucleótidos (por ejemplo, A_1, B_1, C_1, D_1) tiene una secuencia predefinida diferente. En algunas realizaciones, una pluralidad de oligonucleótidos de construcción se sintetiza en características seleccionadas de una pluralidad de soportes de construcción (por ejemplo, superficie 411, 412, 415), cada pluralidad de oligonucleótidos tiene una secuencia predefinida diferente. Según algunas realizaciones, los oligonucleótidos de construcción se sintetizan por la extensión del cebador utilizando oligonucleótidos unidos al soporte como plantillas. En algunas realizaciones, una primera pluralidad de oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos 461 en el apoyo 411) se puede incubar con un cebador en presencia de una polimerasa, en condiciones que favorecen la extensión del cebador. La primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte puede tener en su extremo 3' una secuencia diseñada para ser complementaria a una secuencia de cebador (por ejemplo, sitio de unión al cebador). En algunas realizaciones, el cebador es un cebador que contiene uracilo múltiple (por ejemplo, cebadores de escisión USER™) y después de la extensión, el cebador se elimina utilizando la endonucleasa USER™ como se describe en el presente documento. Del mismo modo, pueden sintetizarse los oligonucleótidos de construcción $A_2, B_2, C_2, D_2, \dots, A_m, B_m, C_m, D_m$ que tienen una secuencia predefinida de forma paralela o secuencial por la extensión del cebador formando de este modo duplexos. Como se ilustra en la Figura 8, esto da lugar a una pluralidad de matrices que tienen en su superficie (411, 12, 415) una pluralidad de duplexos que comprenden los oligonucleótidos de construcción y los oligonucleótidos de plantilla (oligonucleótidos 461: A_1, B_1, C_1, D_1 en la superficie 411; oligonucleótidos 462 A_2, B_2, C_2, D_2 en la superficie 412; oligonucleótidos 465 A_m, B_m, C_m, D_m en la superficie 415).

Cada pluralidad de matriz de construcción puede diseñarse para tener la misma configuración, siendo cada característica separada de la siguiente característica por la misma distancia y cada característica se dispone de manera similar en la matriz. Por ejemplo, el primer soporte 411 tiene características n que comprenden una primera, una segunda y $n^{\text{ésima}}$ población de oligonucleótidos, respectivamente, cada oligonucleótido tiene una secuencia predefinida. Se podría apreciar que cada pluralidad de oligonucleótidos puede diferir de la otra pluralidad de oligonucleótidos por una o más bases. Del mismo modo, el soporte 412 tiene una primera, una segunda y $n^{\text{ésima}}$ población de oligonucleótidos en el que la primera población de oligonucleótidos del primer soporte tiene la secuencia complementaria a la primera población de oligonucleótidos del segundo soporte (como se ilustra en la Figura 9c). En una realización ejemplar, la primera población de oligonucleótidos del primer soporte tiene una secuencia de extremo 3' complementaria a la primera población de oligonucleótidos del segundo soporte. Del mismo modo, la población $m^{\text{ésima}}$ de oligonucleótidos del soporte $m^{\text{ésimo}}$ tiene una región de secuencia complementaria a la población $(m-1)^{\text{ésima}}$ de oligonucleótidos del soporte $(m-1)^{\text{ésimo}}$.

En algunas realizaciones, una primera matriz de construcción se alinea a una matriz de anclaje 410 en la que cada función comprende un oligonucleótido de anclaje unido al soporte (A_0, B_0, C_0, D_0). Cada oligonucleótido de anclaje puede ser monocatenario y puede comprender en su extremo 5' una secuencia complementaria al extremo terminal 5' de una pluralidad de oligonucleótidos de la primera matriz de construcción. Se debe apreciar que para la síntesis altamente paralela de una pluralidad de polinucleótidos que tiene una secuencia predefinida diferente, cada pluralidad de oligonucleótidos de anclaje puede tener una secuencia de extremo 5' diferente. En algunas realizaciones, la secuencia de extremo 5' diferente puede diferir en una o más bases. En algunas realizaciones, la matriz de construcción y la matriz de anclaje se alinean verticalmente, la matriz de construcción define una matriz superior y la matriz de anclaje define una matriz inferior. En realizaciones preferentes, la matriz de anclaje y las matrices de construcción se diseñan para tener la misma configuración, siendo cada característica separada de la siguiente característica por la misma distancia y cada característica se dispone de manera similar en la matriz. Se debería apreciar que el diseño de las matrices de construcción y de anclaje permite el alineamiento de los oligonucleótidos de anclaje y de construcción, los oligonucleótidos de anclaje tienen una secuencia complementaria a los oligonucleótidos de construcción. Después del alineamiento de las matrices de construcción y de anclaje, los oligonucleótidos de construcción pueden liberarse en la solución que da lugar a la captura y la hibridación de los oligonucleótidos de construcción a los oligonucleótidos de anclaje. Una segunda población de oligonucleótidos de construcción se inmoviliza en un soporte diferente, entonces se puede agrupar muy próxima a la matriz de anclaje y se añade secuencialmente al híbrido que comprende el oligonucleótido de anclaje y la primera población de oligonucleótidos de construcción.

La primera matriz de construcción se puede alinear y aproximarse a la matriz de anclaje. En algunas, el alineamiento y la aproximación de la matriz de construcción y la matriz de anclaje están en presencia de un medio fluido o solución que permite la difusión posterior proximal y la transferencia de oligonucleótidos de construcción de la matriz de construcción superior a la matriz de anclaje inferior (se ilustra en la dirección vertical en la Figura 9). Se pueden liberar oligonucleótidos de construcción de la matriz de construcción en un medio fluido, por ejemplo en condiciones que favorecen la disociación de los duplexos. Por ejemplo, los duplexos pueden disociarse calentando las funciones seleccionadas o la matriz completa a una temperatura superior a la temperatura de fusión de los duplexos de oligonucleótidos de construcción. Haciendo referencia a la Figura 9a-b, un primer conjunto de oligonucleótidos de construcción que tienen diferentes secuencias predefinidas (A_1, B_1, C_1, D_1) se libera de la primera matriz de construcción en un medio fluido 485 y se captura en la matriz de anclaje formando una pluralidad de duplexos (por ejemplo duplexos 441, $A_0A_1, B_0B_1, C_0C_1, D_0D_1$). Haciendo referencia a la Figura 9c-d, una segunda matriz de construcción se alinea y se aproxima a la matriz de anclaje que comprende duplexos de oligonucleótidos de construcción de la primera población de anclaje. El alineamiento y aproximación de la segunda matriz de construcción y la matriz de anclaje en presencia de un medio fluido permiten la transferencia proximal posterior de un segundo conjunto de oligonucleótidos de construcción de la segunda matriz de construcción a la matriz de anclaje. Haciendo referencia a la Figura 9d, el segundo conjunto de oligonucleótidos de construcción A_2, B_2, C_2, D_2 , 462 se libera de la micromatriz 412 y se hibrida en la micromatriz de anclaje 410 para formar polinucleótidos 442 $A_0A_1A_2, B_0B_1B_2, C_0C_1C_2, D_0D_1D_2$. Los polinucleótidos ensamblados resultantes pueden ligarse entonces incluyendo una ligasa, por ejemplo ADN ligasa Taq y sus componentes de reacción necesarios, en el medio fluido para formar moléculas únicas unidas covalentemente. En algunas realizaciones, la ligasa puede suplementarse con una ADN polimerasa por desplazamiento sin hebra para llenar los espacios y aumentar la eficiencia del ligamiento. Tal proceso puede repetirse con los miembros adicionales del conjunto de micromatrices de construcción hasta que se sinteticen los polinucleótidos de longitud deseada en la matriz del oligonucleótido de anclaje.

En algunas realizaciones, la corrección de errores puede incluirse entre cada repetición del proceso y/o al final del proceso de ensamblaje para aumentar la población relativa de los polinucleótidos sintetizados sin desviarse de las secuencias deseadas. Tal corrección de errores puede incluir la secuenciación directa y/o la aplicación de las enzimas de corrección de errores tales como nucleasas de corrección de errores (por ejemplo, CEL I), corrección de errores basada en homólogos de unión de MutS o MutS u otras proteínas de unión mal apareadas, otros medios de corrección de errores conocidos en la materia, o cualquier combinación de los mismos. En una realización ejemplar, CEL I puede añadirse a los duplexos de oligonucleótidos en el medio fluido. CEL I es una endonucleasa específica mal apareada que escinde todos los tipos de mal apareamiento como polimorfismos de nucleótido únicos, pequeñas inserciones o deleciones. La adición de la endonucleasa CEL I da lugar a la escisión de los oligonucleótidos

bicatenarios en el sitio o región del mal apareamiento. La Figura 9e representa una matriz de anclaje 410 que tiene en su superficie una pluralidad de polinucleótidos 452 que se han ensamblado mediante el proceso descrito en las Figuras 9a-d. Los polinucleótidos ensamblados pueden contener uno o más errores de secuencia 500 (se ilustra por una cruz). Una nucleasa correctora de errores tal como CEL I se puede utilizar para escindir el polinucleótido bicatenario en tales sitios de errores resultantes en los polinucleótidos escindidos 453 como se muestra en la Figura 9f.

En algunas realizaciones, el alineamiento y la aproximación de la primera matriz de construcción a la matriz de anclaje están en presencia de un medio fluido y una membrana porosa. Según algunas realizaciones, una membrana porosa se coloca entre la matriz de construcción y la matriz de anclaje para limitar la difusión lateral de los oligonucleótidos de construcción en el medio fluido a las características no seleccionadas de la matriz de anclaje (Figura 10). Se debe apreciar que la membrana permeable puede limitar la difusión del oligonucleótido de construcción principalmente en la dirección vertical disminuyendo de este modo la difusión lateral de los oligonucleótidos de construcción a los oligonucleótidos de anclaje sin corresponder. Por ejemplo, la membrana puede ser una membrana de polímero poroso con poros de tamaño uniforme. En algunas realizaciones, la membrana tiene tamaños de poro suficientes para el paso relativamente libre de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el tamaño de poro puede oscilar de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm o más. Preferentemente, el tamaño del poro no es mayor que aproximadamente la distancia entre diferentes oligonucleótidos A_1 , B_1 etc. En una realización preferente, el factor de relleno de poros o la relación de abertura es tan grande como sea posible. Las membranas adecuadas incluyen aquellas descritas en: *Polymer Membranes with Two-Dimensionally Arranged Pores Derived from Monolayers of Silica Particles*, Feng Yan y Werner A. Goedel Chem. Mater., 2004, 16 (9), pág 1622-1626.

Se debe apreciar que, para ciertas situaciones, es beneficioso asegurar que un alto porcentaje de los sitios disponibles en la matriz de anclaje capture los oligonucleótidos de construcción, en lugar de dejarse sin llenar debido a la recaptura de los oligonucleótidos de construcción por la matriz de construcción. Con el fin de aumentar la probabilidad de captura por la matriz de anclaje, puede llevarse a cabo la unión covalente de al menos algunos de los oligonucleótidos de construcción a la matriz de anclaje. Haciendo referencia a la Figura 11, se representa una modificación del proceso en la Figura 9. La Figura 11 ilustra el alineamiento y la aproximación de una primera matriz de construcción que comprende al menos dos oligonucleótidos de construcción de solapamiento diferentes a una matriz de anclaje en un medio fluido o solución que comprende una ligasa y los componentes de reacción necesarios y la transferencia posterior proximal de los oligonucleótidos de la matriz de construcción a la matriz de anclaje. En algunas realizaciones, cada característica en una matriz de oligonucleótido de construcción se diseña para contribuir dos o más oligonucleótidos de solapamiento que se van a capturar mediante una población del oligonucleótido de anclaje en una característica seleccionada de la matriz de anclaje. Haciendo referencia a la Figura 11a, cada característica de la matriz del oligonucleótido de construcción 420 transporta dos oligonucleótidos de construcción 481 (por ejemplo, A_1 y A_2) por oligonucleótido de anclaje (por ejemplo, A_0). Los oligonucleótidos de construcción A_1 y A_2 pueden liberarse en los medios de fluido o solución 485 que residen entre la matriz de construcción 420 y la matriz de anclaje 410. En algunas realizaciones, la solución comprende además una ligasa 180 de manera que cuando los oligonucleótidos de construcción A_1 y A_2 se ensamblan en el anclaje A_0 (Figura 11b), el oligonucleótido A_2 se liga covalentemente al anclaje A_0 . Esta disposición y la presencia de ligasa proporcionan la captura preferente de oligonucleótidos de construcción por el oligonucleótido de anclaje en la matriz de anclaje.

En algunas realizaciones, la matriz(o matrices) de oligonucleótidos de construcción y la matriz de oligonucleótido de anclaje se diseñan como el número de oligonucleótidos de construcción que se van a transferir a la matriz de anclaje están en exceso estequiométrico correspondiente a cada oligonucleótido de anclaje. Este diseño permite una probabilidad sustancialmente mayor que los oligonucleótidos de construcción que se van a capturar por cada uno de los oligonucleótidos de anclaje, aumentando de ese modo el rendimiento paso a paso en la síntesis de los polinucleótidos predefinidos.

La Figura 12 representa el alineamiento y la aproximación de una primera matriz de construcción a una matriz de anclaje en un medio fluido y la transferencia posterior proximal de oligonucleótidos de construcción de la matriz de construcción a la matriz de anclaje, en el que el número de oligonucleótidos de construcción está en exceso estequiométrico correspondiente a cada oligonucleótido de anclaje. Haciendo referencia a la Figura 12, la matriz de anclaje 430 se diseña de manera que comprende estequiométricamente menos oligonucleótidos de anclaje (A_0 , B_0 , C_0 , D_0) en comparación con el número de oligonucleótidos de construcción proporcionados por la matriz de construcción 411 para cada oligonucleótido de anclaje correspondiente. Este diseño asegura que se favorece estequiométricamente la unión de los oligonucleótidos de construcción a cada oligonucleótido de anclaje en la matriz de anclaje. Haciendo referencia a la Figura 12a y con fines ilustrativos, se representan tres oligonucleótidos de construcción en cada característica de la matriz de construcción 411 para cada oligonucleótido de anclaje en la matriz de anclaje 430. La matriz del oligonucleótido de construcción 411 se alinea en relación a la matriz de oligonucleótido de anclaje 430. Centrándose en el alineamiento del oligonucleótido de construcción A_1 con el oligonucleótido de anclaje A_0 , después de la disociación del oligonucleótido de construcción A_1 de su correspondiente oligonucleótido de plantilla, cada una de las tres copias de A_1 tiene cuatro posibles sitios de unión: cada copia de A_1 se puede unir de nuevo o recapturarse por la matriz de construcción 411 (3 sitios potenciales) o unirse al oligonucleótido de anclaje A_0 . Después de la captura, uno de los cuatro sitios de unión potenciales

permanecerá vacío. Puesto que es igualmente probable para cada uno de los sitios de unión permanecer vacío, la probabilidad de que A_0 permanezca vacía es del 25 %, y la probabilidad de que A_0 esté ocupada es del 75 %. Con el fin de aumentar incluso aún más la probabilidad de unión de oligonucleótidos de construcción a los oligonucleótidos de anclaje, la relación de oligonucleótidos de construcción a los oligonucleótidos de anclaje puede ser aún más

5 asimétrica. En algunas realizaciones, la relación de oligonucleótidos de construcción a los oligonucleótidos de anclaje es al menos 10:1, al menos 100:1, al menos 1000:1, al menos 10^4 :1, al menos 10^5 :1, al menos 10^6 :1.

Se debe apreciar que un método para aumentar la eficiencia de la construcción de polinucleótidos deseados es reducir el número de etapas en el proceso de construcción. En algunas realizaciones, los polinucleótidos se sintetizan utilizando un método de construcción jerárquico, en el que múltiples matrices de anclaje, después de varias rondas de transferencia de matrices de construcción, se pueden utilizar como matrices de construcción en las siguientes etapas. Un proceso jerárquico geoméricamente reduce el tiempo para ejecutar el mismo número de transferencias, así como el número de transferencias realizadas en cada matriz de anclaje, reduciendo por consiguiente el impacto de la pérdida gradual. La Figura 13a ilustra dos matrices de anclaje 470 y 471, que se han sometido a una serie de transferencias de las matrices de construcción, dando lugar a polinucleótidos sintetizados unidos a la superficie 472 y 473, respectivamente. Como se representa, se ha ligado una hebra de los polinucleótidos sintetizados a los anclajes originales a partir de dichas matrices de anclaje, de tal manera que por ejemplo, la longitud del polinucleótido sintetizado es más larga que la de A_0 (si la matriz de anclaje original es similar a 410 o 430 de La Figura 11 o Figura 12, respectivamente). No se ligó una liberación de las hebras del polinucleótido a la matriz de anclaje que da lugar a la transferencia de polinucleótidos entre las matrices, como se muestra en la Figura 13b. La presencia de una ligasa y los componentes de reacción del ligamiento necesarios dan lugar a la unión covalente de los polinucleótidos entre sí. Cabe señalar que, para fines de ilustración, la transferencia de polinucleótidos se muestra a partir de la matriz de anclaje 471 a la matriz de anclaje 470, aunque la transferencia se distribuirá entre ambas matrices. Con el fin de reducir la tasa de errores total, los polinucleótidos sintetizados inmovilizados a la superficie 472 y 473 pueden exponerse en primer lugar a una nucleasa que corrige los errores como se describe en la descripción de la Figura 9e-f. Dado que algunas nucleasas de corrección de errores se escinden en la unión del ácido nucleico monocatenario y bicatenario, los polinucleótidos 472 y 473, pueden diseñarse para ser completamente bicatenarios o se pueden convertir en bicatenarios mediante la adición adicional de oligonucleótidos que llenan el espacio a los polinucleótidos 472 y 473 seguido del ligamiento.

Debe tenerse en cuenta que la descripción de las reacciones de ensamblaje en el contexto de oligonucleótidos no se pretende que sea limitante. Por ejemplo, otros polinucleótidos (por ejemplo, los polinucleótidos monocatenarios, bicatenarios, fragmentos de restricción, productos de amplificación, polinucleótidos de origen natural, etc.) se pueden incluir en una reacción de ensamblaje, junto con uno o más oligonucleótidos, con el fin de generar un polinucleótido de interés.

Los aspectos de la invención pueden ser útiles para un intervalo de aplicaciones que implican la producción y/o uso de los ácidos nucleicos sintéticos. Como se describe en el presente documento, la invención proporciona métodos para producir ácidos nucleicos sintéticos con una mayor fidelidad y/o para reducir el coste y/o el tiempo de las reacciones de ensamblaje sintéticas. Los ácidos nucleicos ensamblados resultantes pueden amplificarse *in vitro* (por ejemplo, utilizando PCR, LCR, o cualquier técnica de amplificación adecuada), amplificada *in vivo* (por ejemplo, a través de la clonación en un vector adecuado), aislado y/o purificado.

Los aspectos de los métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento pueden comprender la eliminación de las secuencias de ácido nucleico que contienen el error como se describe en el presente documento. Las secuencias de ácido nucleico libres de errores pueden enriquecerse por la eliminación de secuencias que contienen errores o nucleótido(s) que contiene(n) errores. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser oligonucleótidos de construcción, o productos ensamblados, tales como subensamblados o polinucleótidos finales deseados. En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos pueden liberarse en la solución desde el soporte utilizando métodos conocidos en la materia, tales como, por ejemplo, escisión enzimática o amplificación. Esta etapa puede tener lugar en microvolumen(es) individual(es) localizado(s) que contiene(n) sólo la(s) región(es) o característica(s) de interés o en un único volumen. En algunas realizaciones, la eliminación de las secuencias de ácido nucleico que contiene errores se lleva a cabo en una microgota. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser cualquier polinucleótido bicatenario que tiene una secuencia predefinida. La amplificación puede llevarse a cabo en una o más etapas durante un proceso de ensamblaje que da lugar a un grupo de oligonucleótidos bicatenarios o productos ensamblados. Se podría apreciar que tal grupo puede comprender heteroduplexos (secuencias de ácidos nucleicos bicatenarios que tienen uno o más errores de secuencia) y homoduplexos (secuencias de ácidos nucleicos bicatenarios libres de errores o secuencias de ácidos nucleicos bicatenarios que tienen errores de secuencias complementarias). Como se ilustra en la Figura 14, los ácidos nucleicos bicatenarios pueden contener uno o más errores de secuencia (heteroduplexos ilustrados por una cruz). Las nucleasas CEL (CEL I o II) son endonucleasas específicas mal apareadas conocidas por cortar el ácido nucleico bicatenario en ambas hebras en los sitios de sustitución de una sola base, pequeña delección o inserción pequeña. CEL I escinde el ácido nucleico en el lateral 3' del sitio de mal apareamiento, generando un saliente 3' monocatenario de uno o más nucleótidos. En algunas realizaciones, la endonucleasa CEL I (Surveyor™) puede utilizarse para escindir los ácidos nucleicos bicatenarios en estos sitios de errores que dan lugar a un grupo de secuencias de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos que contienen errores escindidos que tienen un saliente 3', y homoduplexos libres de errores como se

ilustra en la Figura 14c. El(los) nucleótido(s) mal apareado(s) puede(n) eliminarse utilizando una polimerasa T4 y/o una polimerasa Klenow que tiene una actividad de exonucleasa 3'-5', generando de este modo un grupo de ácidos nucleicos bicatenarios libres de errores (homoduplexos como se muestra en la Figura 14d). En algunas realizaciones, el grupo de secuencias de ácido nucleico puede amplificarse después, tal como la reacción en cadena de la polimerasa, PCR), utilizando cebadores en los extremos (Figura 14e). Los cebadores pueden ser cebadores universales, cebadores semiuniversales o cebador específico a la secuencia terminal de la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, a los duplexos se les permite disociarse en primer lugar y volver a hibridarse antes de someter el grupo de los ácidos nucleicos a amplificación. Este proceso permitirá la detección y eliminación de errores complementarios que pueden haber permanecido sin detectar por las endonucleasas específicas del mal apareamiento

Un ácido nucleico ensamblado (sólo o clonado en un vector) puede transformarse en una célula huésped (por ejemplo, una célula procariota, eucariota, de insecto, de mamífero, u otro huésped). En algunas realizaciones, la célula huésped puede utilizarse para propagar el ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula huésped. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede sustituir una región de ácido nucleico correspondiente en el genoma de la célula (por ejemplo, mediante recombinación homóloga). Por consiguiente, los ácidos nucleicos pueden utilizarse para producir organismos recombinantes. En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana puede ser un genoma completo o fragmentos grandes de un genoma que se utilizan para sustituir la totalidad o parte del genoma de un organismo huésped. Los organismos recombinantes también pueden utilizarse para varias aplicaciones de investigación, industrial, agrícola, y/o médica.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse durante el ensamblaje de grandes moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, más grandes que 5000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, más largas que aproximadamente 10000, más largas que aproximadamente 25000, más largas que aproximadamente 50000, más largas que aproximadamente 75000, más largas que aproximadamente 100000 nucleótidos, etc.). En una realización ejemplar, los métodos descritos en este documento pueden utilizarse durante el ensamblaje de un genoma entero (o un gran fragmento del mismo, por ejemplo, aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más) de un organismo (por ejemplo, de un organismo viral, bacteriano, de levadura, u otro organismo procariota o eucariota), que incorpora opcionalmente modificaciones específicas en la secuencia en una o más localizaciones deseadas.

Los aspectos de los métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento pueden incluir la automatización de uno o más actos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, una o más etapas de una amplificación y/o reacción de ensamblaje pueden automatizarse utilizando uno o más dispositivos automatizados de manipulación de muestras (por ejemplo, uno o más dispositivos de manipulación automatizados de líquidos o fluido). Los dispositivos y procedimientos automatizados pueden utilizarse para administrar reactivos de reacción, incluyendo uno o más de los siguientes: ácidos nucleicos de partida, tampones, enzimas (por ejemplo, una o más ligasas y/o polimerasas), nucleótidos, sales, y cualquier otro agente adecuado tal como agentes estabilizadores. Los dispositivos y procedimientos automatizados también pueden utilizarse para controlar las condiciones de reacción. Por ejemplo, puede utilizarse un ciclador térmico automatizado para controlar las temperaturas de reacción y cualquier ciclo de temperatura que se puede utilizar. En algunas realizaciones, un láser de barrido puede automatizarse para proporcionar una o más temperaturas de reacción o ciclos de temperatura adecuados para la incubación de polinucleótidos. Del mismo modo, puede automatizarse el análisis posterior de los productos de polinucleótidos ensamblados. Por ejemplo, la secuenciación puede automatizarse utilizando un dispositivo de secuenciación y protocolos de secuenciación automatizados. Las etapas adicionales (por ejemplo, amplificación, clonación, etc.) también pueden automatizarse utilizando uno o más dispositivos apropiados y protocolos relacionados. Debe tenerse en cuenta que uno o más del dispositivo o componentes del dispositivo descritos en el presente documento pueden combinarse en un sistema (por ejemplo, un sistema robótico) o en un microentorno (por ejemplo, una cámara de reacción microfluídica). Las mezclas de reacción del ensamblaje (por ejemplo, muestras de reacción líquidas) pueden transferirse de un componente del sistema a otro utilizando dispositivos y procedimientos automatizados (por ejemplo, la manipulación robótica y/o transferencia de muestras y/o recipientes de muestras robóticas, incluyendo los dispositivos de pipeteo automatizados, microsistemas, etc.). El sistema y cualquier componente del mismo pueden controlarse mediante un sistema de control.

Por consiguiente, las etapas del método y/o aspectos de los dispositivos proporcionados en el presente documento pueden automatizarse utilizando, por ejemplo, un sistema informático (por ejemplo, un sistema controlado por ordenador). Un sistema informático en el que pueden implementarse los aspectos de la tecnología proporcionada en el presente documento, puede incluir un ordenador para cualquier tipo de procesamiento (por ejemplo, análisis secuencial y/o control del dispositivo automatizado como se describe en el presente documento). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que pueden proporcionarse ciertas etapas de procesamiento mediante uno o más dispositivos automatizados que forman parte del sistema de ensamblaje. En algunas realizaciones, un sistema informático puede incluir dos o más ordenadores. Por ejemplo, un ordenador puede acoplarse, a través de una red, a un segundo ordenador. Un ordenador puede llevar a cabo el análisis secuencial. El segundo ordenador puede controlar uno o más dispositivos de síntesis y ensamblaje automatizados en el sistema. En otros aspectos, los ordenadores adicionales pueden incluirse en la red para controlar uno o más análisis o actos de procesamiento. Cada equipo puede incluir una memoria y un procesador. Los ordenadores pueden tener cualquier forma, que según los aspectos

de la tecnología proporcionados en el presente documento no se limitan a implementarse en cualquier plataforma informática particular. Del mismo modo, la red puede tener cualquier forma, incluyendo una red privada o una red pública (por ejemplo, Internet). Los dispositivos de visualización pueden asociarse a uno o más dispositivos y ordenadores. Alternativamente, o además, un dispositivo de visualización puede ubicarse en un sitio remoto y conectarse para visualizar la salida de un análisis según la tecnología proporcionada en el presente documento. Las conexiones entre los diferentes componentes del sistema pueden realizarse a través de cable, fibra óptica, transmisión inalámbrica, transmisión vía satélite, cualquier otra transmisión adecuada, o cualquier combinación de dos o más de los anteriores.

Cada uno de los diferentes aspectos, realizaciones, o actos de la tecnología proporcionados en este documento pueden automatizarse e implementarse independientemente en cualquiera de las formas. Por ejemplo, cada aspecto, realización, o acto puede implementarse de forma independiente utilizando hardware, software o su combinación. Cuando se implementa en software, el código de software puede ejecutarse en cualquier procesador adecuado o colección de procesadores, si se proporciona en un único ordenador o se distribuye entre varios ordenadores. Debe tenerse en cuenta que cualquier componente o colección de componentes que realizan las funciones descritas anteriormente puede considerarse genéricamente como uno o más controladores que controlan las funciones discutidas previamente. Uno o más controladores pueden implementarse de muchas maneras, tal como con hardware diseñado, o con hardware de propósito general (por ejemplo, uno o más procesadores) que se programan utilizando microcódigo o software para realizar las funciones mencionadas previamente.

A este respecto, debe tenerse en cuenta que una implementación de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento comprende al menos un medio legible por ordenador (por ejemplo, una memoria de ordenador, un disquete, un disco compacto, una cinta, etc.) codificado con un programa de ordenador (es decir, una pluralidad de instrucciones), que cuando se ejecuta en un procesador, realiza una o más de las funciones mencionadas previamente de la tecnología proporcionada en el presente documento. El medio legible por ordenador puede transportarse de tal manera que el programa almacenado en el mismo se puede cargar en cualquier fuente de sistema informático para implementar una o más funciones de la tecnología proporcionadas en el presente documento. Además, debe tenerse en cuenta que la referencia a un programa informático cuando se ejecuta, realiza las funciones descritas previamente, no se limita a un programa de aplicación ejecutado en un ordenador huésped. Más bien, el término de programa informático se utiliza en el presente documento en un sentido genérico para referirse a cualquier tipo de código informático (por ejemplo, software o microcódigo) que puede emplearse para programar un procesador para implementar los aspectos discutidos previamente de la tecnología proporcionada en el presente documento.

Debe tenerse en cuenta que, según varias realizaciones de la tecnología proporcionadas en el presente documento en las que los procesos se almacenan en un medio legible por ordenador, los procesos implementados en el ordenador pueden, durante el curso de su ejecución, recibir la entrada manualmente (por ejemplo, de un usuario).

Por consiguiente, el control del nivel del sistema general de los dispositivos de ensamblaje o componentes descritos en el presente documento puede realizarse por un controlador del sistema que puede proporcionar señales de control a los sintetizadores de ácidos nucleicos asociados, dispositivos de manipulación de líquidos, termocicladores, dispositivos de secuenciación, componentes robóticos asociados, así como otros sistemas adecuados para la realización de entrada/salida deseadas u otras funciones de control. Por lo tanto, el controlador del sistema junto con cualquier controlador de dispositivo forma entre sí un controlador que controla el funcionamiento de un sistema de ensamblaje de ácido nucleico. El controlador puede incluir un sistema de procesamiento de datos de fin general, que puede ser un ordenador de uso general, o la red de ordenadores de uso general, y otros dispositivos asociados, incluyendo dispositivos de comunicaciones, módems, y/u otros circuitos o componentes para realizar la entrada/salida deseada u otras funciones. El controlador también puede implementarse, al menos en parte, como un único circuito integrado especializado (por ejemplo, ASIC) o una matriz de ASICs, teniendo cada uno una sección de procesador principal o central para el control general a nivel de sistema, y secciones separadas dedicadas a realizar diversos cálculos, funciones y otros procesos diferentes bajo el control de la sección del procesador central. El controlador también puede implementarse utilizando una pluralidad de circuitos o dispositivos separados dedicados programables integrados u otros electrónicos, por ejemplo, circuitos electrónicos cableados o lógicos tales como circuitos de elementos distintos o dispositivos lógicos programables. El controlador también puede incluir otros componentes o dispositivos, como dispositivos de entrada/salida del usuario (monitores, pantallas, impresoras, un teclado, un dispositivo de puntero del usuario, pantalla táctil, u otra interfaz de usuario, etc.), dispositivos de almacenamiento de datos, accionamientos por motor, enlaces, controladores de válvulas, dispositivos robóticos, bombas de vacío y otros, sensores de presión, detectores, fuentes de alimentación, fuentes de impulsos, dispositivos de comunicación u otros circuitos o componentes electrónicos, etcétera. El controlador también puede controlar el funcionamiento de otras partes de un sistema, tales como procesamiento de la orden del cliente automatizado, control de calidad, envasado, envío, facturación, etc., para realizar otras funciones adecuadas conocidas en la materia, aunque no se describen con detalle en el presente documento.

Diversos aspectos de la presente invención pueden utilizarse solos, en combinación, o en varias disposiciones que no se discuten específicamente en las realizaciones descritas previamente y por lo tanto no se limitan en su aplicación a los detalles y la disposición de componentes expuestos en la descripción anterior o ilustrados en los

dibujos. Por ejemplo, los aspectos descritos en una realización se pueden combinar de cualquier manera con los aspectos descritos en otras realizaciones.

5 El uso de términos ordinales como "primero", "segundo" "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de la reivindicación o el orden de dichos elementos no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedente u orden de un elemento de la reivindicación sobre otro o el orden temporal en el que se realizan las acciones de un método, sino que se utilizan meramente como etiquetas para distinguir un elemento de la reivindicación que tiene un cierto nombre de otro elemento que tiene un mismo nombre (excepto por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de la reivindicación.

10 Además, la fraseología y terminología empleadas en el presente documento son para fines de descripción y no deben considerarse como limitantes. El uso de "incluyendo", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica", y variaciones de los mismos en el presente documento, pretende abarcar los artículos listados en lo sucesivo y equivalentes de los mismos así como artículos adicionales.

15 **EQUIVALENTES**

20 La presente invención proporciona, entre otras cosas novedosos métodos y dispositivos para el ensamblaje del gen de alta fidelidad. Aunque se han discutido realizaciones específicas del sujeto de la presente invención, la memoria descriptiva previa es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de la presente memoria descriptiva. El alcance completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir al menos un polinucleótido que tiene una secuencia predefinida, comprendiendo el método:

- 5 a. proporcionar al menos una primera y una segunda pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte, en donde cada primera y segunda pluralidades de oligonucleótidos tiene una secuencia predefinida y se unen a una característica discreta de un soporte, cada primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte comprende una región de secuencia en su extremo 5' complementario a una región de secuencia de un extremo 5' de la segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte;
- 10 b. generar al menos una primera y una segunda pluralidades de oligonucleótidos de construcción complementarios a la primera y la segunda pluralidades de oligonucleótidos unidos al soporte en una reacción de extensión de la cadena, cada primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción comprende una región de secuencia en su extremo 3' que es complementaria a una región de secuencia de un extremo 3' de la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción;
- 15 c. proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte en una característica seleccionada, en donde el extremo 5' de la pluralidad de un primer oligonucleótido de anclaje es el mismo que una región de secuencia de la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte;
- 20 d. hibridar al menos la primera y la segunda pluralidades de oligonucleótidos de construcción a la pluralidad de oligonucleótidos de anclaje; y
- e. ligar al menos la primera y la segunda pluralidades de oligonucleótidos de construcción, generando de ese modo al menos un polinucleótido.

2. El método de la reivindicación 1, en el que al menos la primera y la segunda pluralidades de oligonucleótidos de construcción se disocian de al menos la primera y la segunda pluralidades de oligonucleótidos unidos al soporte y comprende además, transferir la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción a partir de una primera característica a una característica seleccionada y transferir la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción de una segunda característica a la característica seleccionada, en donde la característica seleccionada comprende la pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte, en donde la característica seleccionada está en el mismo soporte que la primera y la segunda características o en donde la característica seleccionada está en un soporte diferente de la primera y la segunda características.

3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente:

- 35 proporcionar una tercera pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte, en donde cada tercera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte tiene una secuencia predefinida y se une a una tercera característica discreta del soporte, cada tercera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte comprende una región de secuencia en su extremo 3' que es complementaria a una región de secuencia de un extremo 3' de la segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte;
- 40 generar una tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción complementarios a la tercera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte en una reacción de extensión de cadena;
- hibridar al menos la primera, segunda y tercera pluralidades de oligonucleótidos de construcción a la pluralidad de oligonucleótidos de anclaje en la característica seleccionada; y
- 45 ligar al menos la primera, segunda y tercera pluralidades de oligonucleótidos de construcción, produciendo de ese modo al menos un polinucleótido.

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte tiene un sitio de unión al cebador en su extremo 3' y comprende además la hibridación de un cebador a al menos las primera y segunda pluralidades de oligonucleótidos unidos al soporte en condiciones que favorecen la extensión del cebador, formando de este modo duplexos del producto de extensión.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte se sintetiza en el soporte sólido, en el que la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte se deposita en el soporte sólido o en el que la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte se inmoviliza en el soporte a través de su extremo 3'.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte es un dispositivo de micromatrices.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

- 65 proporcionar pluralidades N de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte generando de este modo una primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción que comprende en su extremo 3' una región de secuencia que es complementaria a una región de secuencia en el extremo 3' de un segundo oligonucleótido de construcción, y una pluralidad de oligonucleótidos de construcción N que comprende en su extremo 3' una región

de secuencia que es complementaria a una región de secuencia de una pluralidad de oligonucleótidos de construcción (N-1); y

proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de anclaje que comprende en su extremo 5' una secuencia que es la misma que una región de secuencia de la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte.

5 8. El método de la reivindicación 7, en el que se generan las pluralidades N de oligonucleótidos de construcción complementarios a los oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte y en el que las pluralidades N de los oligonucleótidos de construcción abarcan la secuencia completa del polinucleótido sin espacios.

10 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la región de secuencia del extremo 3' de la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte es idéntica a la región del extremo 5' de los oligonucleótidos de anclaje.

15 10. El método de la reivindicación 4, que disocia además los duplexos de extensión liberando de este modo al menos una primera y una segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción.

20 11. El método de la reivindicación 4, en el que la secuencia del cebador comprende al menos un uracilo y comprende además eliminar el cebador utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII.

25 12. El método de la reivindicación 1, que comprende además
 (i) proporcionar un soporte con una primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte, en donde el extremo 5' de la primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje es complementario al extremo 5' de una primera pluralidad de oligonucleótidos y una segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte, en donde el extremo 5' del segundo oligonucleótido de anclaje es complementario a un oligonucleótido de construcción N terminal;

30 (ii) sintetizar una pluralidad de polinucleótidos bicatenarios unidos al soporte que comprende un saliente monocatenario 5', la pluralidad de secuencias polinucleótidas comprende la secuencia polinucleótida predefinida, en donde el saliente monocatenario 5' de la secuencia polinucleótida predefinida comprende la secuencia de oligonucleótido de construcción N terminal y el extremo 3' monocatenario de la secuencia polinucleótida que comprende la primera secuencia oligonucleótida;

35 (iii) hibridar la pluralidad de polinucleótidos sintetizados con los primeros oligonucleótidos de anclaje; y
 (iv) someter los polinucleótidos sintetizados a condiciones de hibridación para hibridar el saliente 5' del polinucleótido que tiene un oligonucleótido de construcción N terminal en el extremo 5' de la segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje, seleccionando de este modo los polinucleótidos que tienen la secuencia predefinida.

40 13. El método de la reivindicación 12, que comprende uno o más de los siguientes:

45 degradar las secuencias polinucleótidas que tienen un extremo 3' o 5' libre;
 liberar los polinucleótidos que tienen la secuencia predefinida desde el soporte, en donde se liberan los polinucleótidos utilizando una endonucleasa tipo II o en donde los polinucleótidos se liberan utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-ligasa endonucleasa VIII.

50 14. El método de la reivindicación 12, en el que la primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje está separada de la segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje por una distancia correspondiente a la longitud del polinucleótido predefinido.

55 15. El método de la reivindicación 14, en el que el soporte comprende además oligonucleótidos monocatenarios separados unidos al soporte para fijar la distancia entre el primer y el segundo oligonucleótidos de anclaje, y en donde la distancia entre el primer y el segundo oligonucleótidos de anclaje depende de una concentración del primer y del segundo oligonucleótidos de anclaje y de la concentración del oligonucleótido separador.

60 16. El método de la reivindicación 12, en el que la pluralidad de polinucleótidos bicatenarios unidos al soporte se sintetiza mediante extensión de cadena de la polimerasa utilizando como plantillas una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte.

65 17. Una matriz de ácido nucleico, que comprende:
 a. un soporte sólido;
 b. una pluralidad de características discretas asociadas al soporte sólido, en donde cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte que tiene una secuencia predefinida, en donde la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte comprende en su extremo 5' una región de secuencia que es complementaria a una región de secuencia en el extremo 5' de una segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte, en donde una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte N comprende

en su extremo 5' una secuencia complementaria a la región de secuencia del extremo 5' de una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte (N-1); y

c. al menos una primera pluralidad de oligonucleótidos de anclaje que comprende en su extremo 5' una secuencia que es idéntica a una región de secuencia de la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte.

18. La matriz de ácidos nucleicos de la reivindicación 17, que comprende además una segunda pluralidad de oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte, en donde el extremo 5' del segundo oligonucleótido de anclaje es idéntico al extremo 3' de la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte N.

19. Un método para producir una pluralidad de polinucleótidos que tiene una secuencia predefinida, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un primer y un segundo soportes que tienen una pluralidad de características, en donde cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte diferentes que tienen una secuencia predefinida diferente;

(b) generar una primera y una segunda pluralidades de oligonucleótidos de construcción diferentes que tienen secuencias predefinidas diferentes utilizando como plantillas la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte, la primera y la segunda pluralidades de oligonucleótidos de construcción tienen secuencias complementarias de extremo 3';

(c) proporcionar un soporte que comprende una pluralidad de características, en donde cada característica comprende oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte, en donde el extremo 5' de cada pluralidad de oligonucleótidos de anclaje es complementario al extremo 5' de la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción;

(d) hibridar la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción con los oligonucleótidos de anclaje;

(e) hibridar la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción con la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción;

(f) hibridar opcionalmente de forma secuencial una tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción con la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción; y

(g) ligar las pluralidades de oligonucleótidos de construcción.

20. El método de la reivindicación 19, en el que se aplican uno o más de los siguientes:

cada pluralidad de oligonucleótidos de construcción que define cada polinucleótido predefinido se sintetiza en un soporte diferente;

la pluralidad de diferentes polinucleótidos se ensambla en diferentes características de soporte que comprenden los oligonucleótidos de anclaje unidos al soporte;

la etapa de generar la pluralidad de los primeros oligonucleótidos de construcción comprende hibridar una secuencia del cebador que tiene al menos un uracilo con la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte en condiciones que favorecen la extensión del cebador y eliminar el cebador utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-ligasa endonucleasa VIII.

21. El método de la reivindicación 19, que comprende:

(i) proporcionar un primer soporte que comprende una pluralidad de características, en el que cada característica comprende oligonucleótidos monocatenarios de anclaje unidos al soporte, en el que el extremo 5' de cada pluralidad de oligonucleótidos de anclaje es complementario al extremo 5' de una primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción;

(ii) proporcionar un segundo soporte que tiene una pluralidad de características, en el que cada característica comprende una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios de plantilla unidos al soporte, cada pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte tiene una secuencia predefinida diferente;

generar una primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción por extensión de la polimerasa, utilizando como plantillas la pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte;

(iii) colocar el primer y el segundo soportes, de modo que cada característica del segundo soporte se alinee a una característica correspondiente del primer soporte;

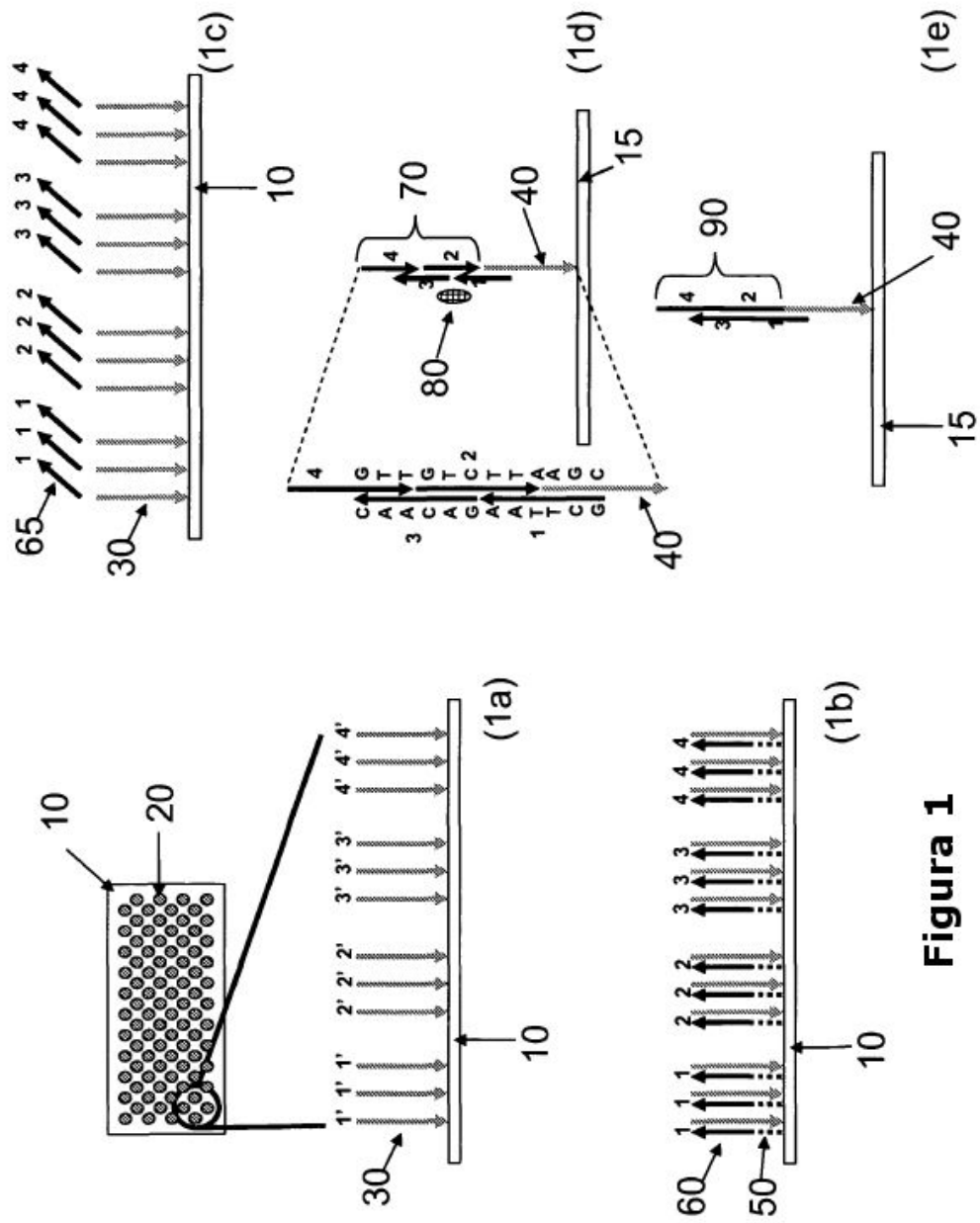
(iv) liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción en una solución en condiciones que favorecen la hibridación de la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción con la pluralidad de oligonucleótidos de anclaje correspondientes; y

(v) repetir opcionalmente las etapas (ii)-(iv) con un tercer soporte que comprende una segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción, la segunda y la tercera pluralidad de oligonucleótidos de construcción tienen secuencias complementarias del extremo 3'.

22. El método de la reivindicación 21, en el que se aplican uno o más de los siguientes:

la etapa de generar la pluralidad de los primeros oligonucleótidos de construcción comprende hibridar una secuencia del cebador que tiene al menos un uracilo con la primera pluralidad de oligonucleótidos unidos al

- soporte en condiciones que favorecen la extensión del cebador y eliminar el cebador utilizando una mezcla de uracilo-ADN glicosilasa (UAG) y ADN glicosilasa-ligasa endonucleasa VIII;
- 5 en donde cada característica del segundo soporte comprende una pluralidad de oligonucleótidos, en donde la pluralidad de oligonucleótidos comprende al menos dos poblaciones de oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias predefinidas, al menos dos poblaciones de oligonucleótidos tienen secuencias complementarias del extremo 3';
- en donde el segundo soporte se coloca arriba y orientado al primer soporte;
- en donde la etapa de liberación de la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción en solución permite la difusión de la primera pluralidad de oligonucleótidos hacia los oligonucleótidos de anclaje;
- 10 en donde la estequiometría de la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción es superior a la estequiometría de los oligonucleótidos de anclaje; y/o
- en donde el tercer soporte comprende una pluralidad de polinucleótidos inmovilizados por hibridación con una pluralidad de oligonucleótidos de anclaje.
- 15 23. El método según cualquiera de las reivindicaciones 21-22, que comprende además ligar los oligonucleótidos de anclaje y la segunda pluralidad de oligonucleótidos de construcción.
24. El método de la reivindicación 21, en el que la etapa de liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de construcción en solución se realiza en presencia de una membrana porosa que permite una difusión vertical sustancial de los oligonucleótidos de construcción hacia los oligonucleótidos de anclaje, en donde la membrana porosa reduce la difusión lateral de los oligonucleótidos de construcción.
- 20 25. El método de la reivindicación 21, en el que la etapa de liberar las dos poblaciones de oligonucleótidos en solución permite la hibridación de la primera población de oligonucleótidos de construcción con la segunda población de oligonucleótidos de construcción y la hibridación de la primera población de oligonucleótidos con el oligonucleótido de anclaje.
- 25 26. El método de la reivindicación 25, en el que la solución comprende una ligasa.
- 30 27. El método según cualquiera de las reivindicaciones 21-26, en el que la pluralidad de polinucleótidos se inmoviliza en el apoyo o está en solución.
28. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en el que se comprende además la exposición de la pluralidad de polinucleótidos a un componente que reconoce y escinde un mal apareamiento en condiciones adecuadas para la escisión de los polinucleótidos bicatenarios que contienen un nucleótido mal apareado.
- 35 29. El método de la reivindicación 28, en el que el componente que reconoce y escinde el mal apareamiento comprende una endonucleasa de mal apareamiento y/o la endonucleasa específica de mal apareamiento es una enzima CEL I.
- 40 30. El método de la reivindicación 17, que comprende además una tercera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte que tiene una secuencia predefinida, en donde la tercera pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte comprende en su extremo 3' una región de secuencia que es complementaria a una región de secuencia en el extremo 3' de una segunda pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte.
- 45



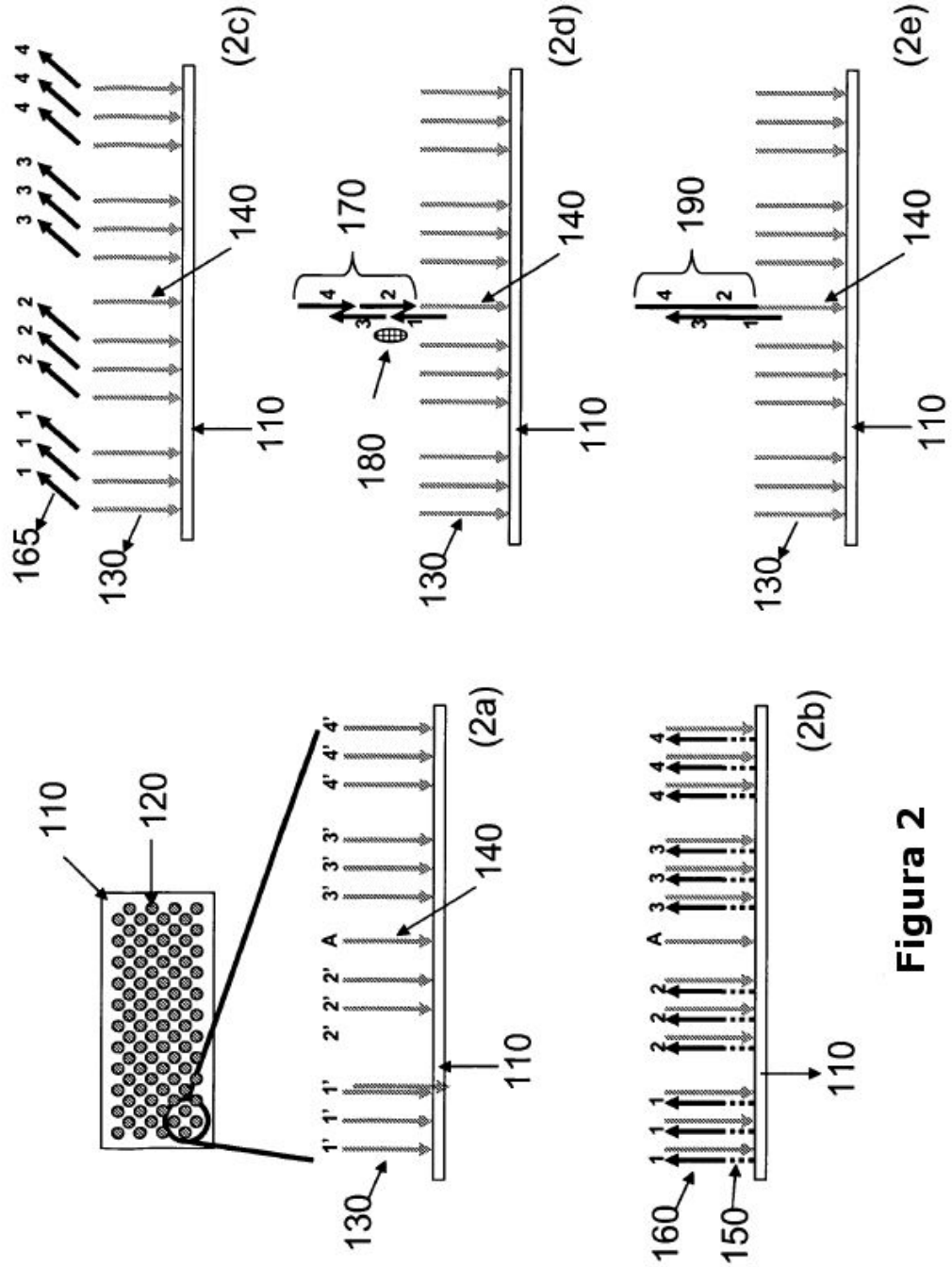


Figure 2

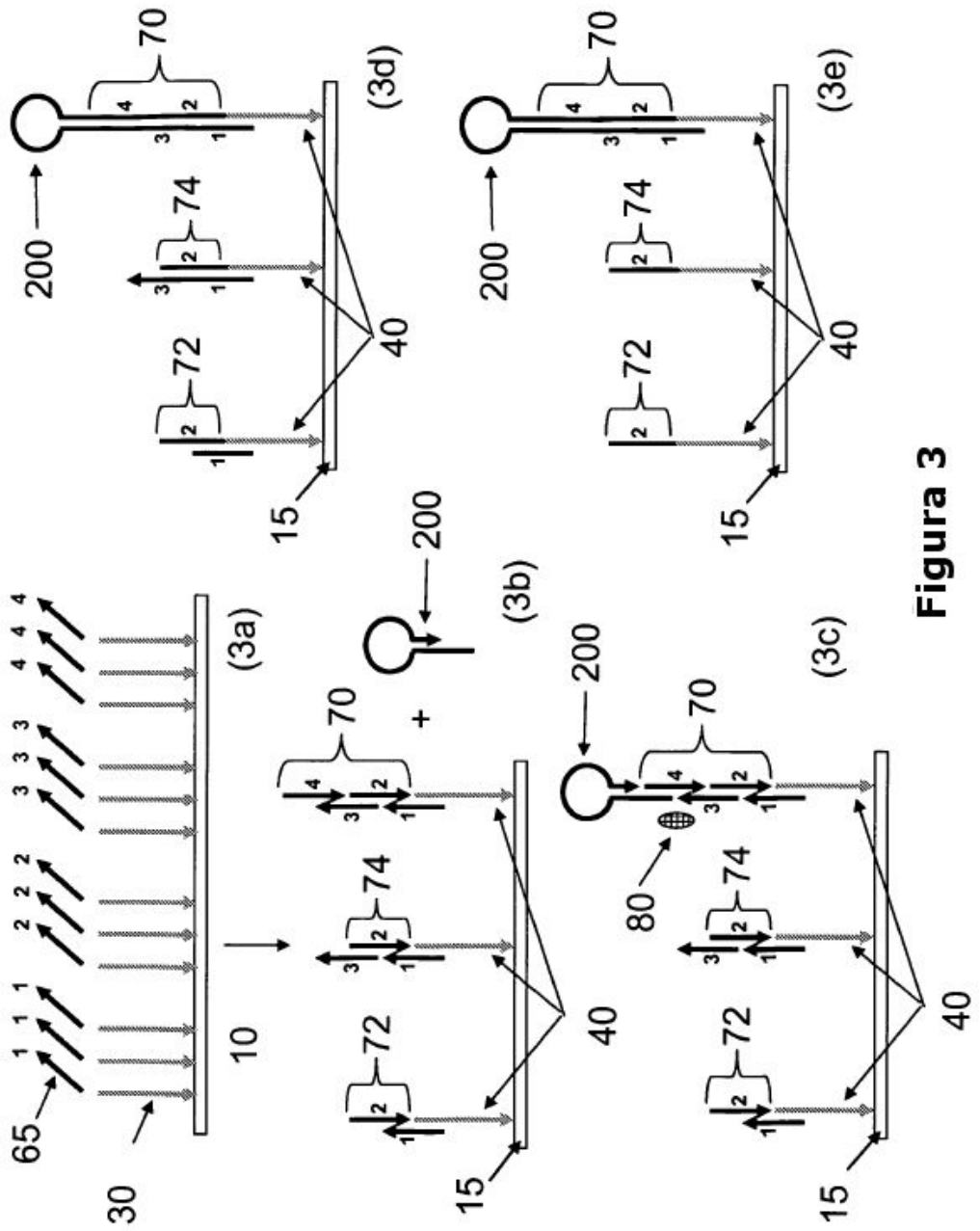


Figure 3

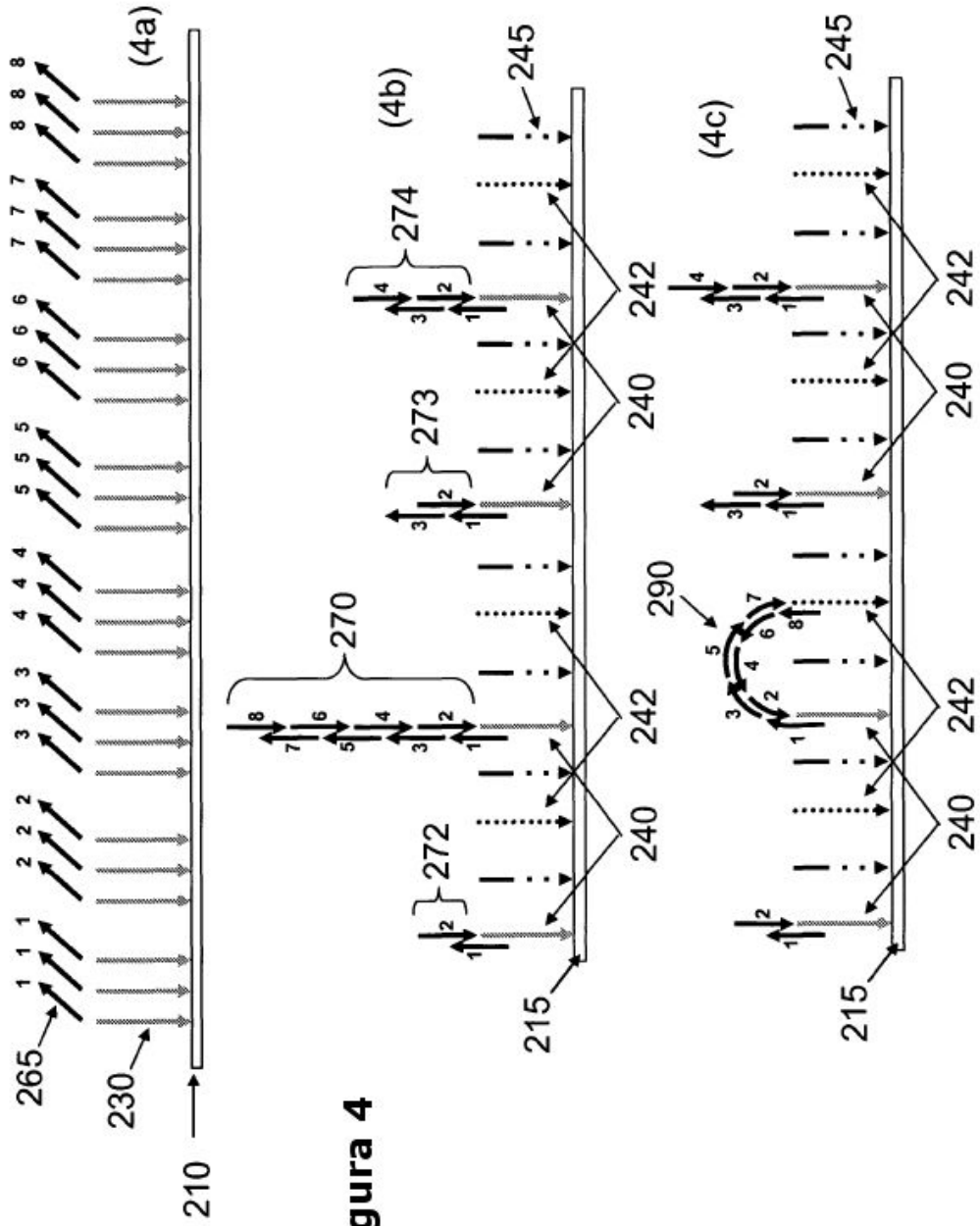
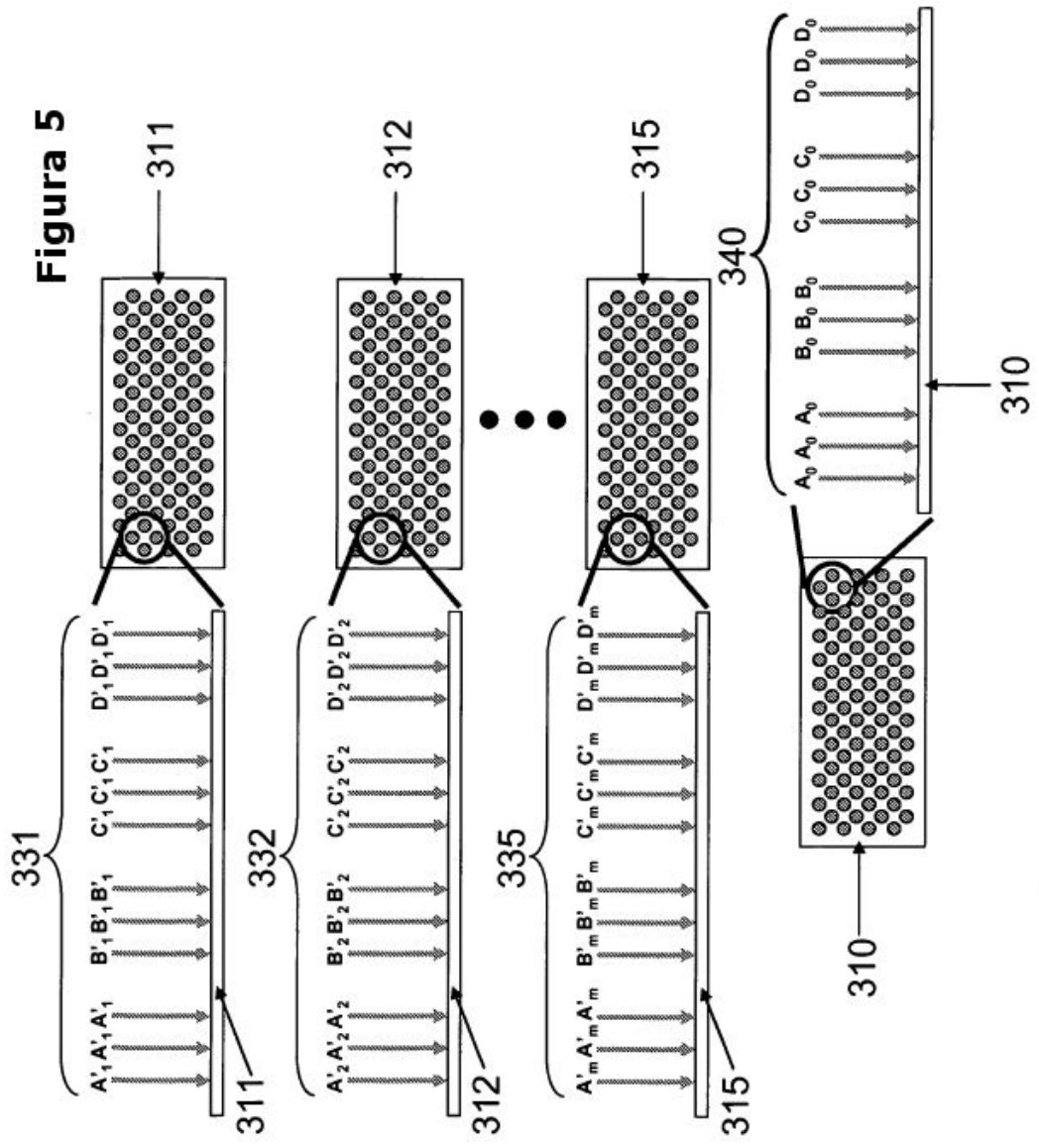
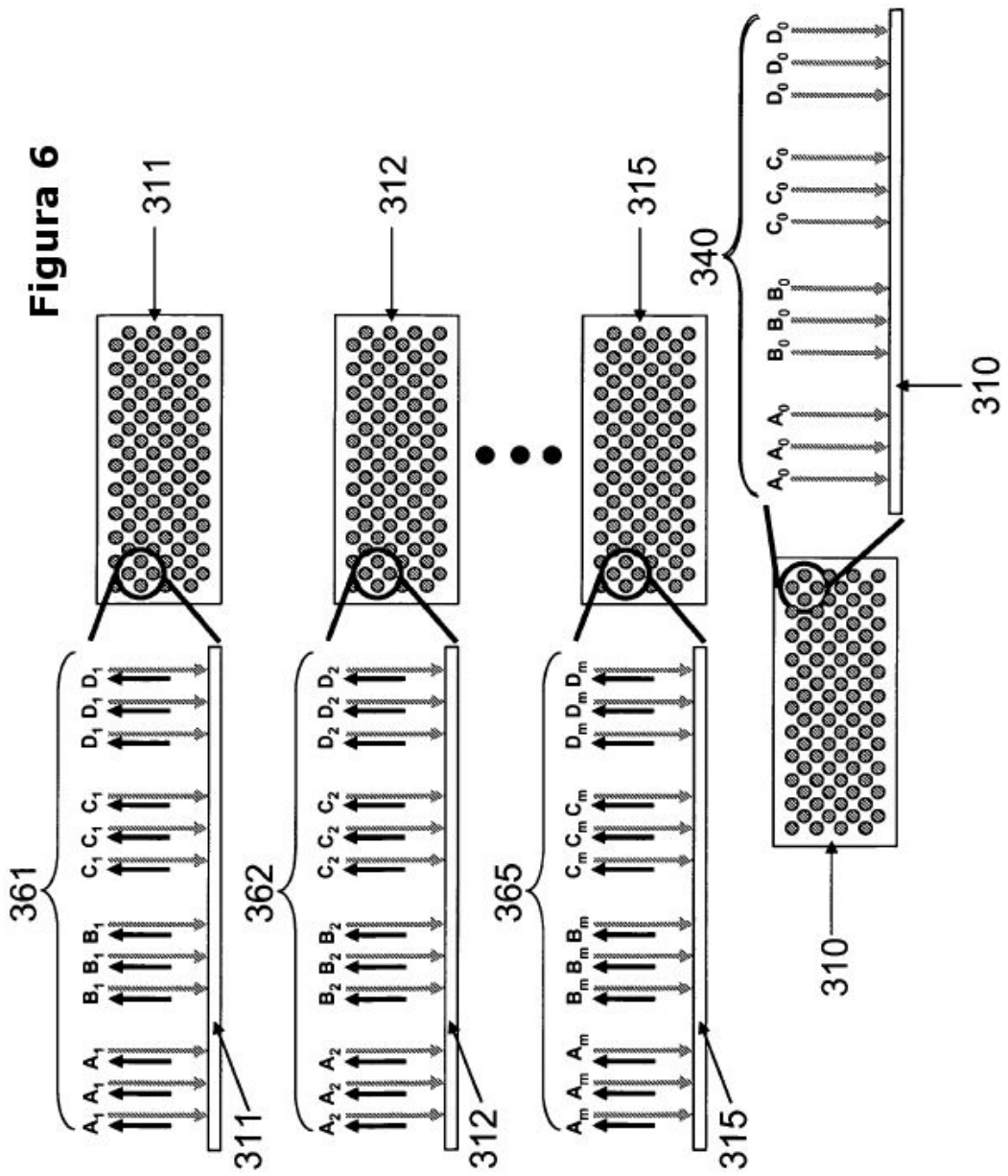


Figure 4





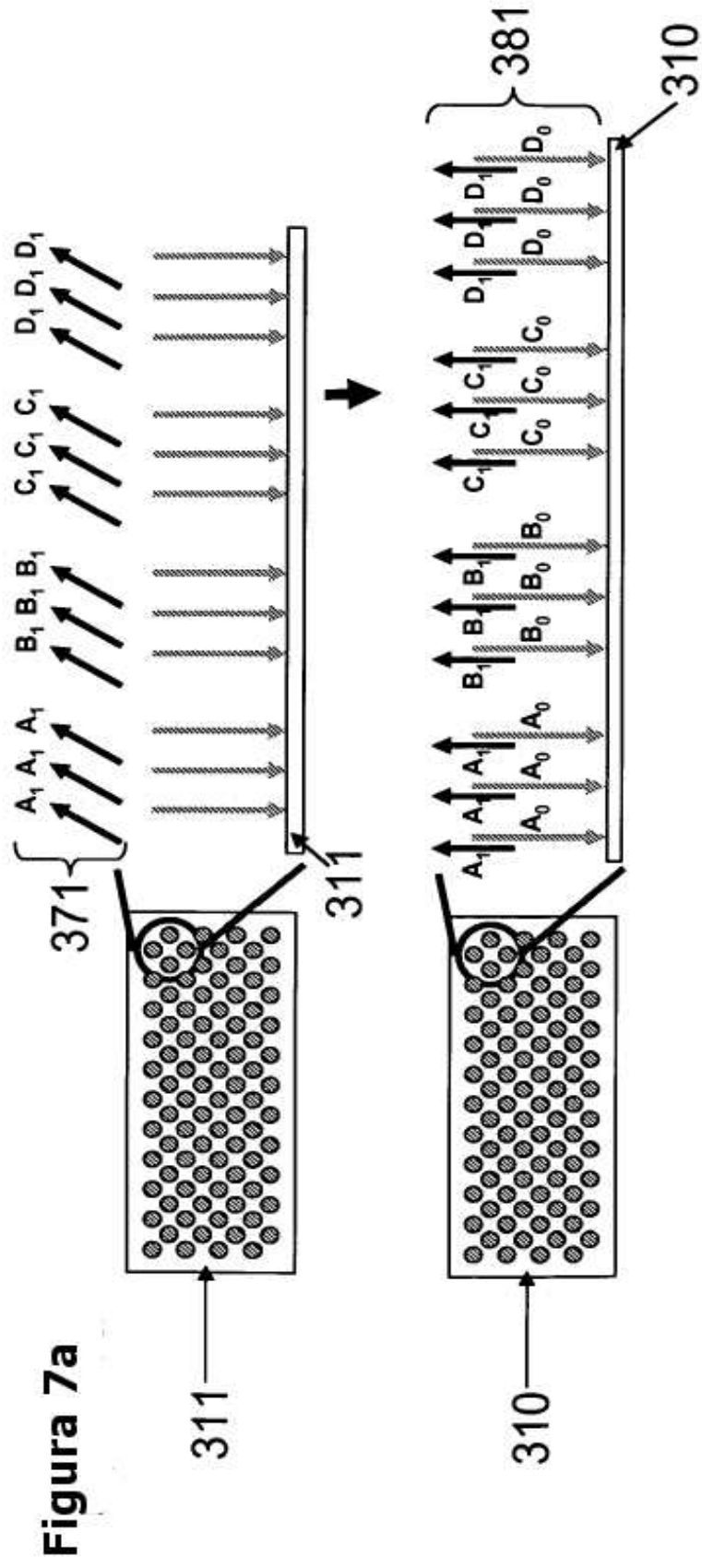


Figura 7b

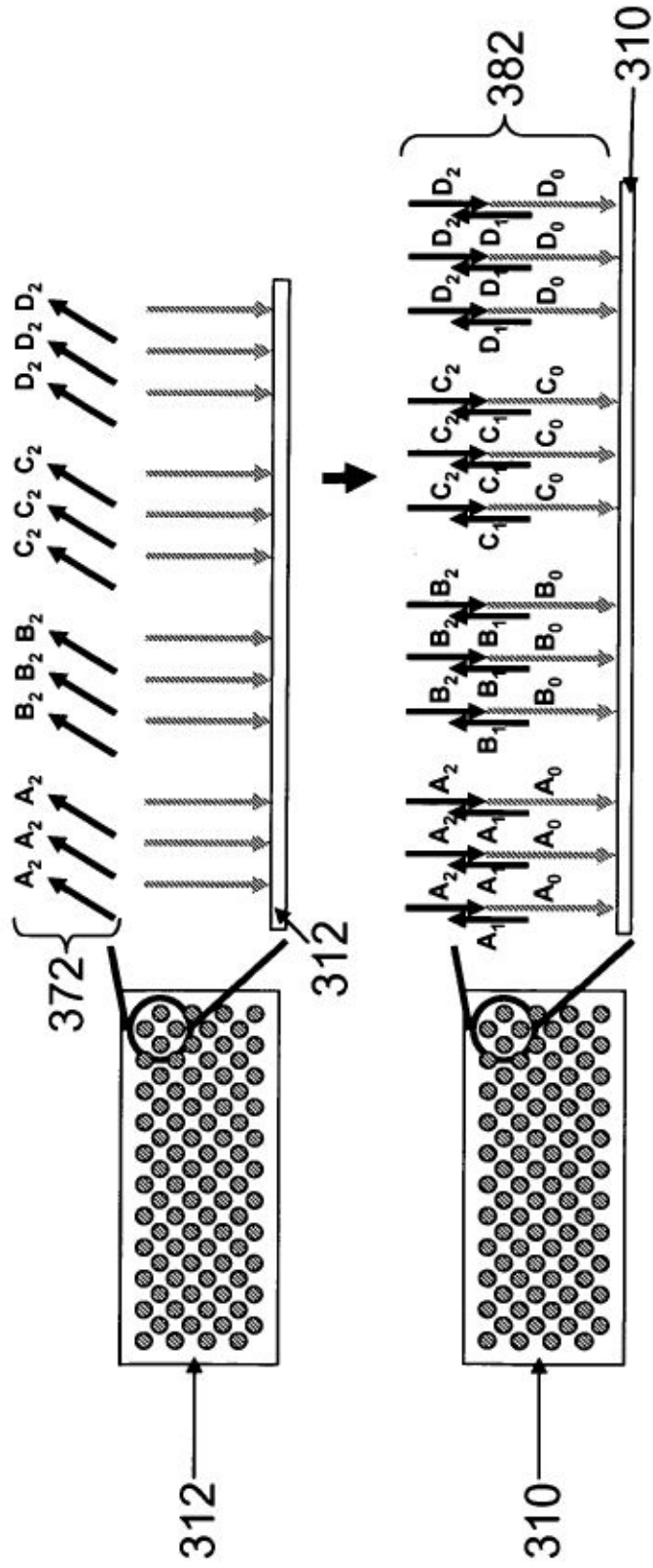
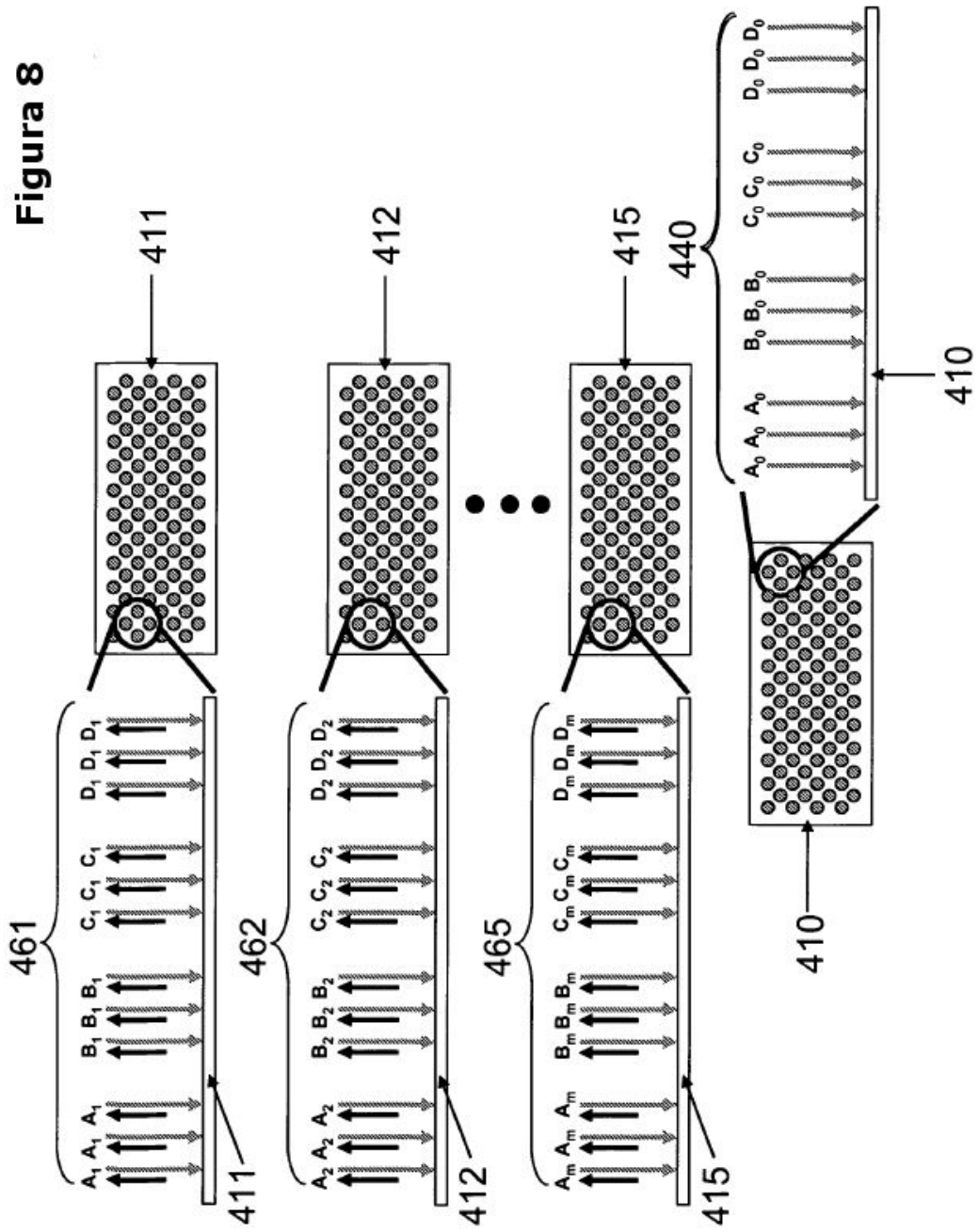


Figura 8



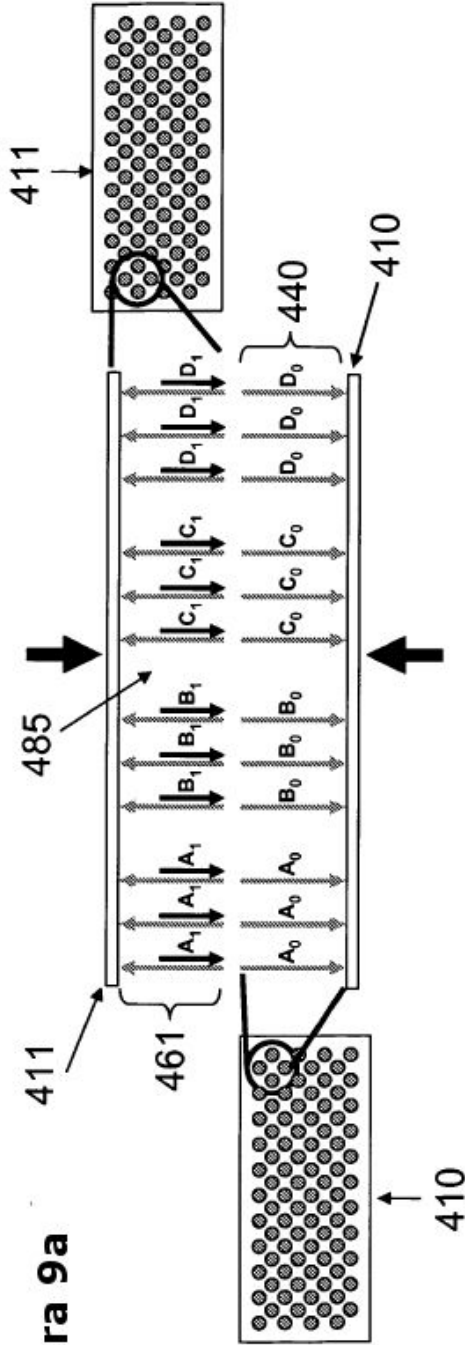


Figura 9a

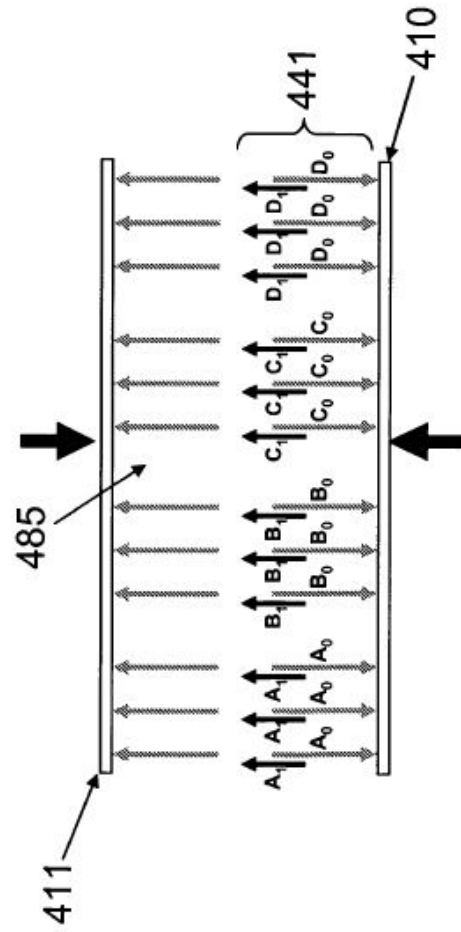


Figura 9b

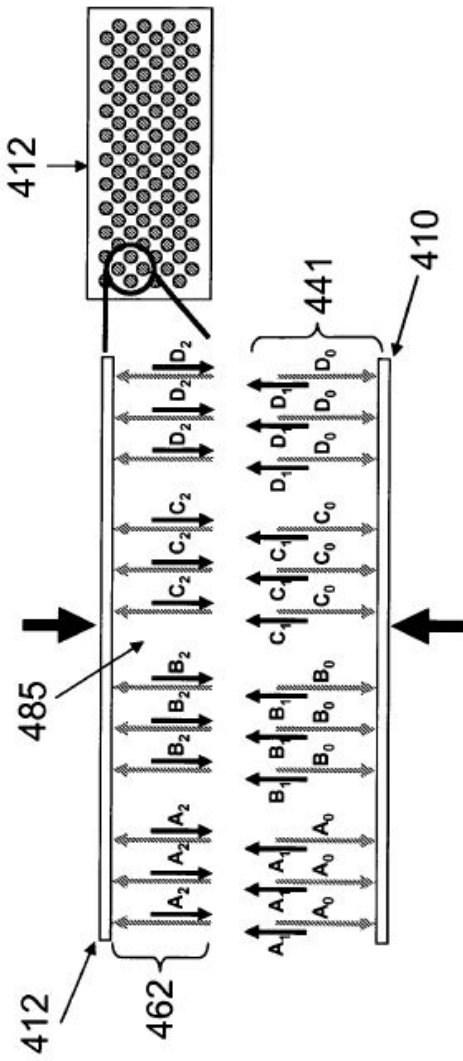


Figura 9c

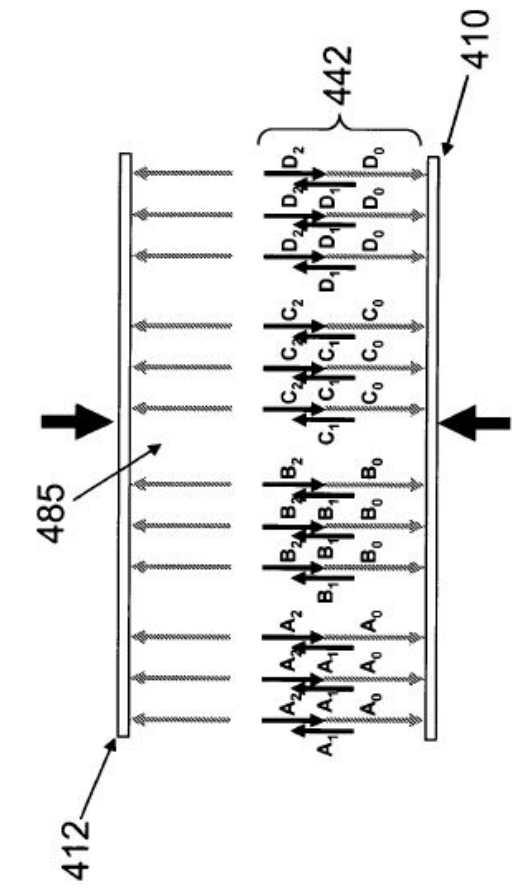


Figura 9d

Figura 9e

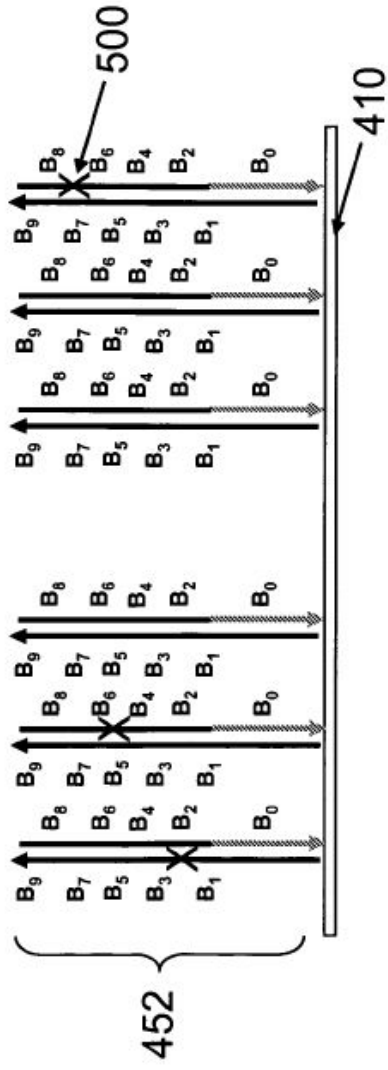
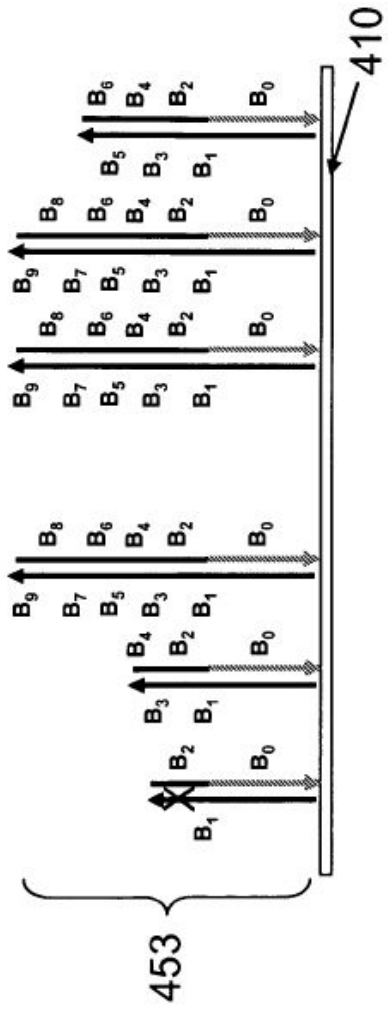


Figura 9f



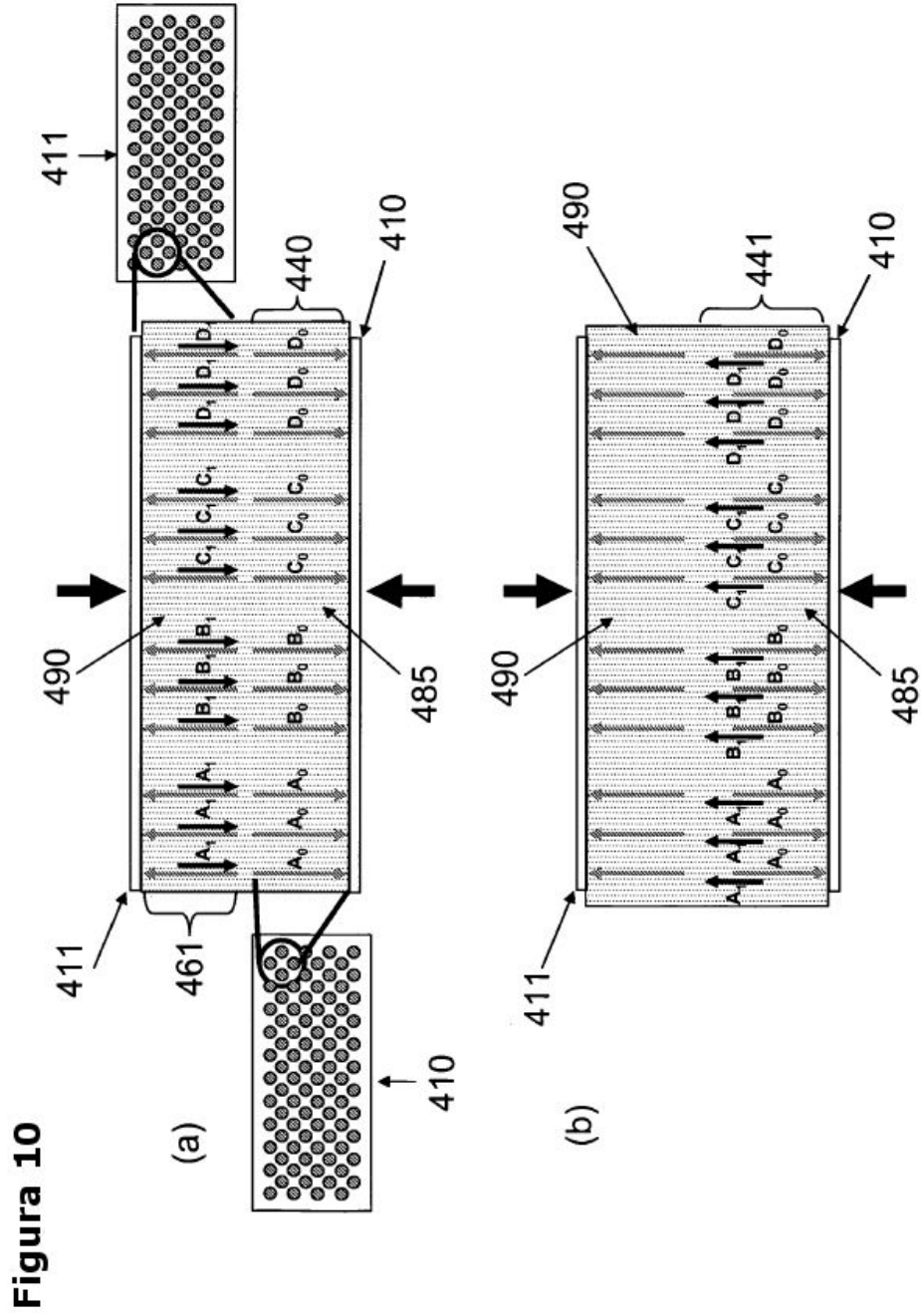


Figure 10

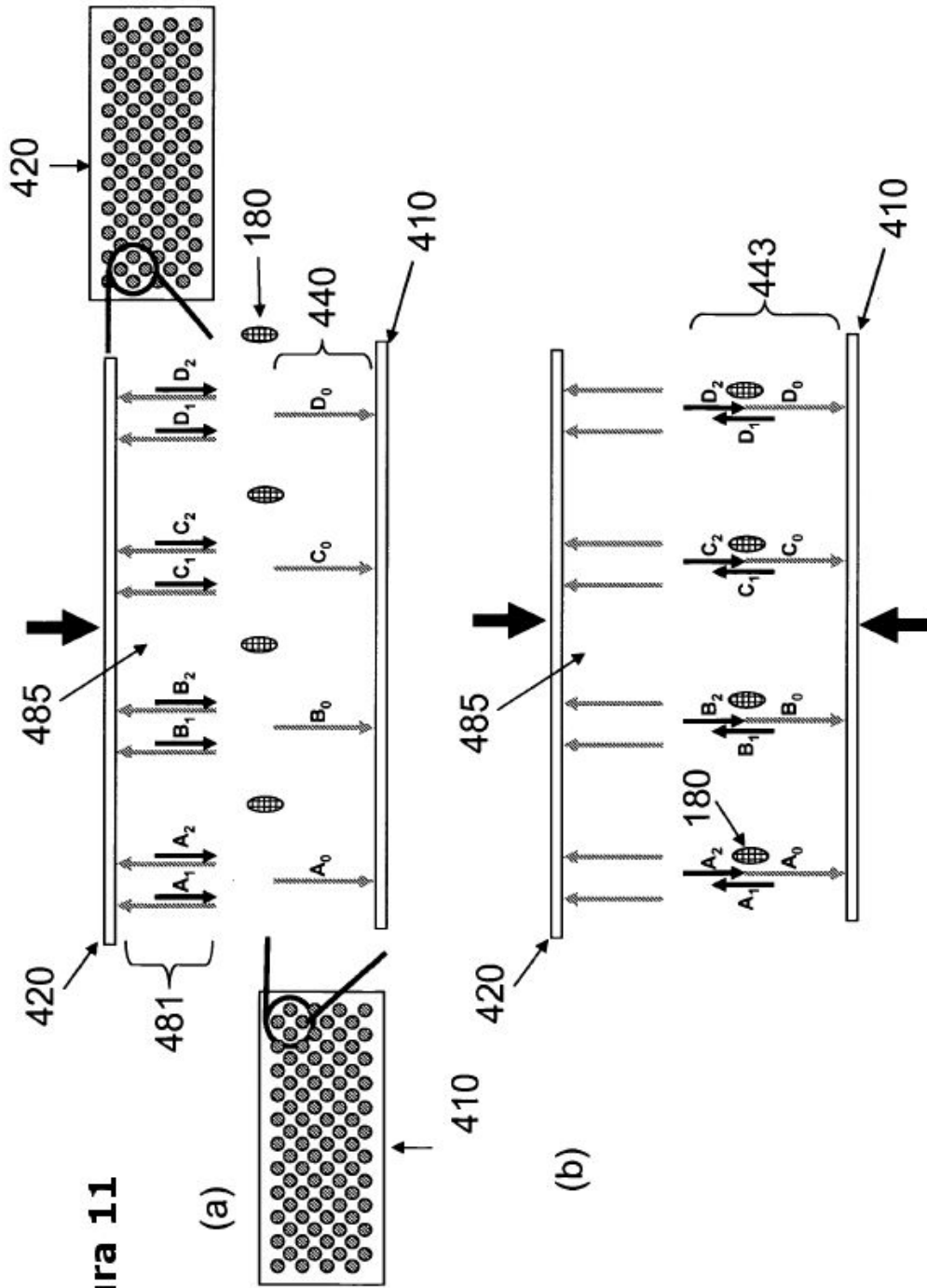
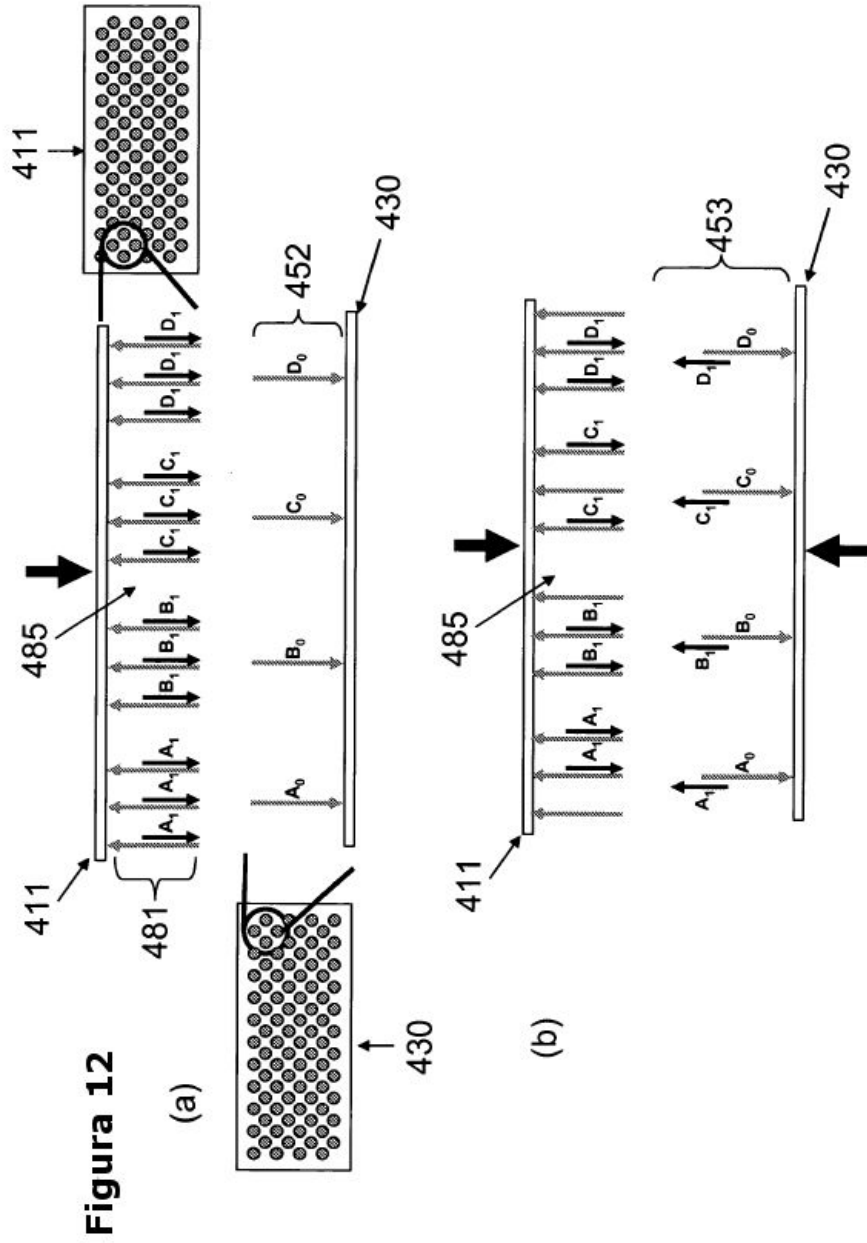


Figure 11



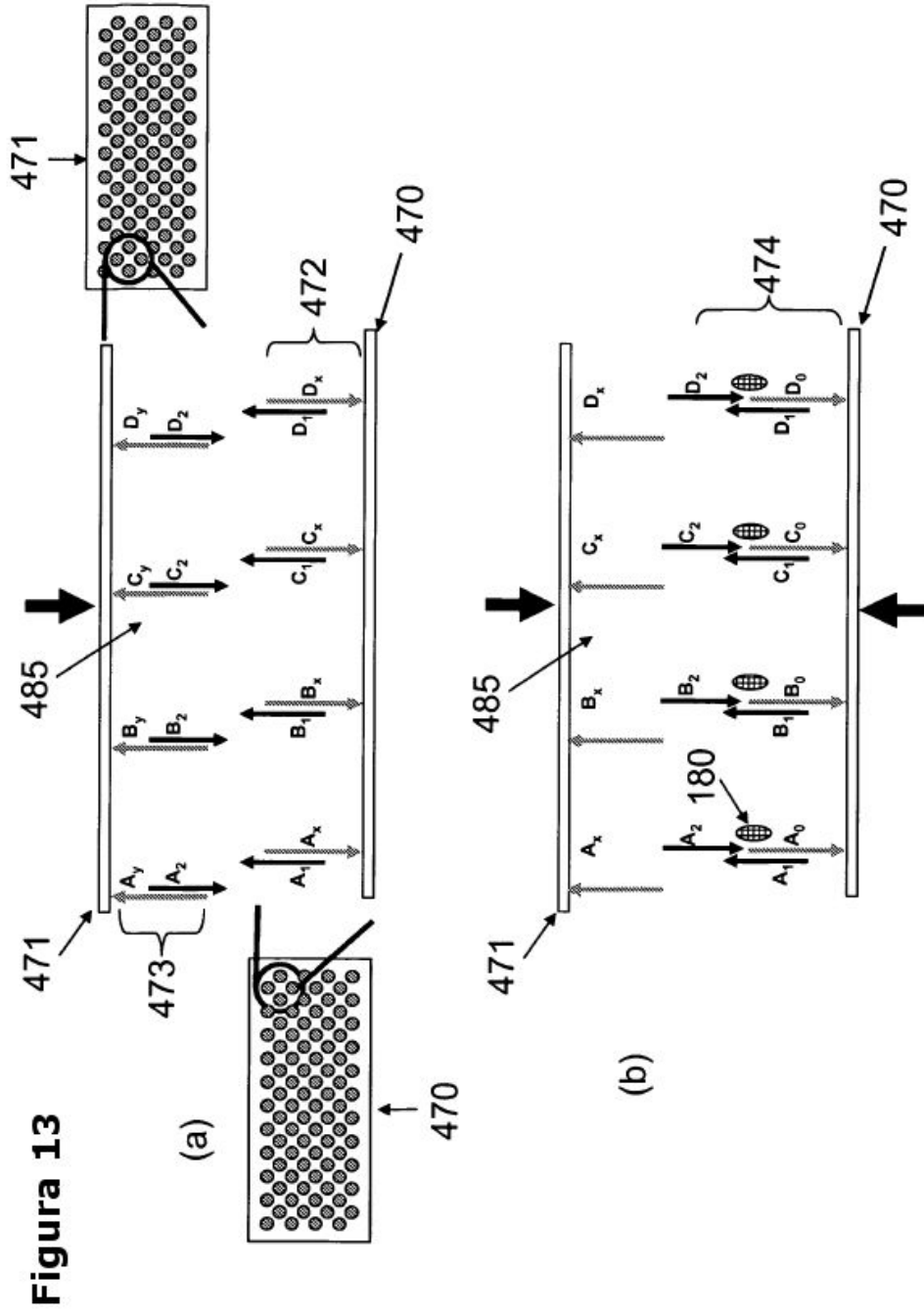


Figure 13

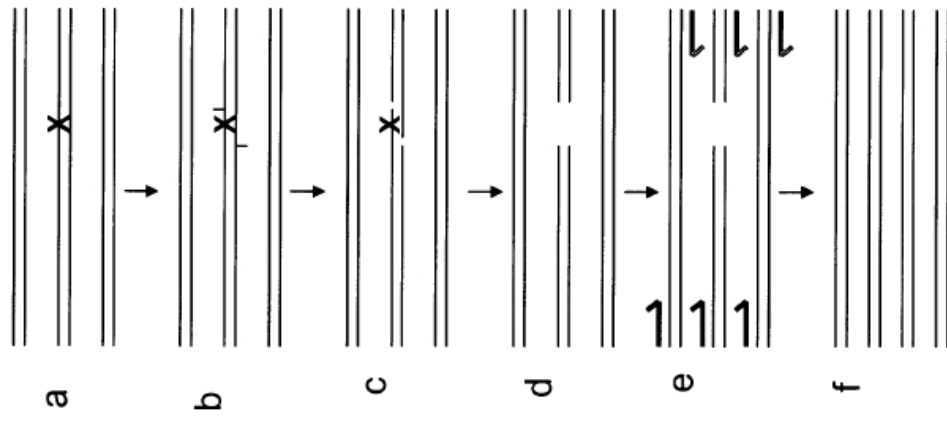


Figura 14